

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DOS CIRCUITOS CENTRAIS E
PERIFÉRICOS QUE CONTROLAM AS ATIVIDADES DIGESTIVAS DO CARACOL**

Megalobulimus abbreviatus

TESE DE DOUTORADO

MALCON ANDREI MARTINEZ PEREIRA

PORTO ALEGRE

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS

**CARACTERIZAÇÃO MORFOFUNCIONAL DOS CIRCUITOS CENTRAIS E
PERIFÉRICOS QUE CONTROLAM AS ATIVIDADES DIGESTIVAS DO CARACOL**

Megalobulimus abbreviatus

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: NEUROCIÊNCIAS, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR.

MALCON ANDREI MARTINEZ PEREIRA

ORIENTADORA: DRA. DENISE MARIA ZANCAN

PORTO ALEGRE

2012

“Quanto ao motivo que me impulsionou foi muito simples. Para alguns, espero, poderá ser suficiente por ele mesmo. É a curiosidade em todo o caso a única espécie de curiosidade que vale a pena ser praticada com um pouco de obstinação: não aquela que procura assimilar o que convém conhecer, mas a que permite separar-se de si mesmo. De que valeria a obstinação do saber se ele assegurasse apenas a aquisição dos conhecimentos e não de certa maneira, e tanto quanto possível, o descaminho daquele que conhece? Existem momentos na vida onde a questão é saber se: pode-se pensar diferente do que se pensa, e perceber diferentemente do que se vê, é indispensável para continuar a olhar ou a refletir. Talvez me digam que com estes jogos consigo mesmo permanecer nos bastidores, e que no máximo eles fazem parte desses trabalhos de preparação que desaparecem por si sós a partir do momento em que produzem seus efeitos. “

M. FOUCAULT

Você não sabe quanto eu caminhei prá chegar até aqui...

(A estrada, composição de Toni Garrido)

Dedico às grandes mulheres da minha vida:
Uldamar, Minha mãe, **Tia Ilda** e **Anna**
Guiomar, minha avó (in memmoriám), e ao
Meu Pai-drasto **Fernando**. Sem o apoio e
incentivo de vocês eu não teria conseguido.

AGRADECIMENTOS

UFRGS

Agradeço com grande admiração à minha orientadora, Profa. Denise Zancan, que esteve sempre presente, pela dedicação ao longo desse trabalho, pela confiança em mim depositada, pelo profissionalismo, pela amizade desenvolvida neste período e, muitas vezes, pela paciência.

À Profa. Wania Partata pela amizade e constante disposição em ajudar não apenas a mim, mas a todos.

Ao Prof. Rui Fernando Félix Lopes, um grande orientador de estágio de docência com quem redescobri o prazer de ser Professor. Obrigado pela paciência e pelos conselhos.

Ao Prof. Luciano Stürmer de Fraga, o Chefe, que teve paciência para me ensinar a trabalhar com *Megalobolimus* e muitas vezes foi um consultor na execução do trabalho.

Em especial às minhas fiéis escudeiras: Tutti e Babi, que sempre estiveram prontas a auxiliar e demonstraram muita paciência durante este período. Obrigado pelas brigas e pelo prazer de ser infantilóde. A Fabiana “Flipper” Rigon, que muitas vezes dividiu comigo as angústias do Doutorado. A todos os amigos e conhecidos, que em algum momento tiveram uma palavra de alegria, incentivo ou consolo.

A todos os alunos que passaram ou ainda atuam no Laboratório de Neurobiologia Comparada e participaram deste trabalho de alguma forma, ajudando nos experimentos, carregando caixas de terra ou pacotes de alface, e também aos demais colegas do Laboratório por toda a convivência, ajuda e amizade: Andréa, Ana Karine, Alines (Gonçalves & Lérias), Carol, Cris Bilibio, Grazi, Gustavo, Lidiane, Márcia, Maira, Naédia, Renan e Taina.

À Profa. Maria Cristina Faccioni-Heuser pela revisão desta Tese, sugestões sempre valiosas e por toda ajuda ao longo desse período.

Ao Prof. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr pela cedência do microscópio de fluorescência.

Ao Prof. Aldo Lucion e a todo o pessoal do Laboratório de Neurobiologia do Comportamento pelo empréstimo do criostato.

À Profa. Matilde Achaval pela disponibilização do Laboratório de Análise de Imagens e do material para as técnicas histoquímicas e imunohistoquímicas, além de todas as sugestões ao longo deste trabalho.

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

A todos os professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, que estiveram envolvidos na minha formação ao longo do Curso. Em especial ao Anjo-da-guarda Andréia Ferreira.

À CAPES e ao programa CAPES-REUNI pelo auxílio financeiro.

ESPECIAIS

Agradeço ao Fabrício por toda compreensão, amizade, companheirismo e pela paciência de cursar o Doutorado por tabela. Tua ajuda e tua força me ajudaram a concluir esta etapa.

Agradeço especialmente ao Fábio Duro da Silveira, mais que amigo, mais que irmão, um Anjo-da-Guarda. Não tenho palavras para expressar a minha gratidão e amizade profunda por ti, meu amigão Binho, e pela tia Evair.

Ao meu Mano Rouget, Catiane e Gabriel por me acolherem quando precisei, pelo carinho e amizade.

Aos meus Tios e Tias que sempre foram modelos a serem seguidos.

Ao Ricardo Ayalla, meu irmãozasso, Daniel, meu irmãozito, Mariel, Helena, Zetty e aos novos amigos da Portelinha por sempre me lembrarem que existe vida durante o Doutorado.

Disse então, Jesus estas palavras:
Graças te rendo, meu Pai, Senhor do Céu e da Terra, por haveres ocultado estas coisas aos doutos e aos prudentes e por teres revelado aos simples e aos pequenos. **(S. Mateus, 11:25)**

SUMÁRIO

RELAÇÃO DAS FIGURAS E TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
APRESENTAÇÃO DO TEMA	1
MORFOLOGIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES	2
PROSOBRANCHIA & OPISTOBRANCHIA.....	4
PULMONATA.....	8
CONTROLE NERVOSO DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES	13
INERVAÇÃO EXTRÍNSECA DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES	14
INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES.....	24
CÓDIGO QUÍMICO DO CONTROLE NERVOSO DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES	25
2. JUSTIFICATIVA & OBJETIVO	29
3. METODOLOGIA & RESULTADOS	32
COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	32
ARTIGO I.....	33
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	33
METODOLOGIA.....	33
ESTUDO MORFOLOGICO	33
HODOLOGIA	35
RESULTADOS.....	38
ARTIGO II.....	80
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	80
METODOLOGIA.....	80
ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA ATIVIDADE DA AChE.....	81
ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA ATIVIDADE DA NADPH-d	81
HISTOFLUORESCÊNCIA PELO MÉTODO DO AG	82
PROCEDIMENTO DE IMUNOHISTOQUÍMICA	82
RESULTADOS	83
4. DISCUSSÃO	129
5. CONCLUSÕES	146
6. PERSPECTIVAS.....	148
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149
ANEXO I	176
ANEXO II	178

RELAÇÃO DAS FIGURAS & TABELAS

- Figura 1.** Esquematização da organização do SNC em gastrópodes pulmonados. (A) Representação esquemática da organização geral e da localização dos neurônios VD1 e RPD2 em *Lymnaea stagnalis*. (B). Esquematização do SNC e principais nervos *Helix pomatia* (cedido por G. Kerkut, citado por BULLOCK & HORRIDGE, 1965)..... 15
- Figura 2.** Esquematização do sistema nervoso do trato digestivo em *Aplysia*, indicando a distribuição de elementos nervosos na superfície externa do esôfago, papo e moela, que se divide em porção anterior e posterior, em vista ventral (ITO & KUTOKAWA, 2007).....23
- Figura 3.** Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*: **A.** Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. **B.** Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, com o pé estendido (ZANCAN, 1996).....31
- Figura 4.** Identificação geográfica dos municípios de Charqueadas (29°57'17"S - 51°37'31"W) e Minas do Leão (30°07'36"S - 52°02'51"W), Rio Grande do Sul, onde localiza-se o caracol *M. abbreviatus*.

ARTIGO I

- Figure 1.** General morphology of the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.72
- Figure 2.** Central innervation of the gastrointestinal tract and distribution of backfilled neurons in the subesophageal ganglia of *M. abbreviatus*..... 73
- Figure 3.** The stomatogastric nervous system, located in the outer stomach wall of *M. abbreviatus* is constituted by the stomatogastric, gastric, cardiac, and pyloric ganglia.....75
- Figure 4.** Micrographs of the digestive tract of *M. abbreviatus* showing the enteric nervous system (ENS) stained with silver nitrate impregnation (**A-B-C-F-G-H-I**) or with methylene blue (**D-E**).....77
- Table 1:** Number of backfilled neurons of the CNS that constitutes the Gb in *M. abbreviatus*, consistently and coincidentally labeled by the three staining methods.....78
- Table 2:** Number of backfilled neurons of the CNS that constitutes the Rn in *M. abbreviatus*, consistently and coincidentally labeled by the three staining methods.....79

ARTIGO II

- Figure 1.** AChE-activity in horizontal sections of the the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.....123
- Figure 2.** Distribution of NADPHd-activity in the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.....124
- Figure 3.** Fluorescent induced by GA in horizontal sections of the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.....125
- Figure 4.** Distribution of FMRFa-ir neuronal elements in the *M. abbreviatus* Glt.....126
- Figure 5.** 5HT-immunoreactivity in the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.....127
- Figure 6.** GFAP-ir in horizontal sections of midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.....128

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂Ni (SO₄)₂: *ammonium sulfide*
5HT: serotonina
5HT-ir: imunorreativo à serotonina
ABC: complexo avidina-biotina-peroxidase
ACh: acetilcolina
AChE: acetilcolinesterase
AG: ácido glioxílico
CB: células cérebro-buciais
CGC: *cerebral green cells*
CNS: *central nervous system*
CoCl₂: cloreto de cobalto
C-PR: neurônio regulador cérebro-pedal
CVC-1: célula cerebral ventral 1
DAB: diaminobenzidina
ENS: *enteric nervous system*
FMRFa: polipeptídeo fenilalanina-metionina-arginina-fenilalanina-amida
FMRFa-ir: imunorreativo ao FMRFamida
GABA: ácido γ -aminobutírico
Gb: *gastrointestinal branch*
GCP: geradores centrais de padrão
GFAP: proteína fibrilar acídica glial
GFAP-ir: imunorreativo à proteína fibrilar acídica glial
GI: *gastrointestinal tract*
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HRP: *horseradish peroxidase* Type VI (peroxidase de rabanete)
ICBs: interneurônios cérebro-buciais
IgG: imunoglobulina G
LY: *Lucifer Yellow*
LP: *left pedal ganglion*
MCC: *metacerebral cell*
MCG: *metacerebral giant cell*
MP: *myenteric plexus*
N1, N2 e N3: interneurônios geradores centrais de padrão
NADPH-d: dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase
NBT: *nitro blue tetrazolium* (azul de nitrotetrazólio)
NCC: neurônios de comando cerebrais
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
nR: nervo reto-anal

nV: nervo visceral comum
OC: octopamina
Pad: gânglio parietal direito
PAP: peroxidase antiperoxidase
PBS: tampão fosfato salino
PBS-T: Triton X-100 diluído em PBS
Pd: gânglio pedal direito
Pe: gânglio pedal esquerdo
PId: gânglio pleural direito
PM: plexo mioentérico
PP: polipeptídeo pancreático
PS: plexo submucoso
rG: ramo gastrointestinal
Rn: *rectum-anal nerve*
RP: *right pedal ganglion*
RPI: *right pleural ganglion*
SCP: *Small cardioactive peptide*
SD: sistema digestório
SN: sistema nervoso
SNA: sistema nervoso autônomo
SNC: sistema nervoso central
SNE: sistema nervoso entérico
SNEG: sistema nervoso estomatogástrico
SNP: sistema nervoso periférico
SNS: sistema nervoso simpático
SP: *submucous plexus*
STg: *stomatogastric ganglia*
STNS: *stomatogastric nervous system*
TF: tampão fosfato 0,1M, pH 7,4
TM: tampão Tris-Maleato 0,1 M, pH 7,6
TM: tampão Tris-Maleato 0,1M pH 6,0
tGI: trato gastrointestinal
V: gânglio visceral
VG: *visceral ganglion*
VIP: polipeptídeo vasoativo intestinal
Vn: *common visceral nerve*
 α e β -MSH: hormônio estimulador de melanócitos (classes α e β)
 β -NADPH: β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

RESUMO

PEREIRA, M. A. M. **Caracterização morfofuncional dos circuitos centrais e periféricos que controlam as atividades digestivas do caracol *Megalobulimus abbreviatus***. Porto Alegre, 2012. 178p. Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A organização do sistema nervoso que controla as funções digestórias dos moluscos gastrópodes tem sido estudada quanto à constituição dos circuitos neurais subjacentes ao ritmo de deglutição alimentar. Existe, entretanto, uma lacuna no conhecimento da organização do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP) que regulam o segmento médio e posterior do trato digestório. A posição filogenética intermediária, atribuída ao sistema nervoso (SN) do caracol *Megalobulimus abbreviatus*, entre as espécies de Helicidae e os basomatófaros pode constituir uma via para o entendimento do controle da atividade do trato gastrointestinal (tGI) de gastrópodes. Assim sendo, o caracol pulmonado *M. abbreviatus* foi utilizado em um estudo morfológico e neuroquímico que buscou descrever o padrão da inervação central e periférica em um modelo experimental amplamente utilizado na pesquisa neurobiológica. A anatomia macroscópica revelou que o intestino médio constituiu-se pelo estômago, dividido em pró-ventrículo e moela, e intestino, dividido em pró-intestino ou tiflossolear, médio e pós-intestino, enquanto que o intestino posterior constituiu-se pelo reto e ânus. A análise da organização da parede, empregando microscopia óptica, revelou a presença de quatro túnicas constituindo a parede destes órgãos: (i) mucosa, que se constituía por um epitélio colunar intermitente ciliado e lâmina própria; (ii) submucosa, representada pelo tecido conjuntivo frouxo, contendo muitos espaços hemais; (iii) muscular, dividida em camadas circular interna e longitudinal externa, contudo a moela apresentou uma camada disposta obliquamente e as regiões cárdica e pilórica apresentaram esfíncteres muito organizados; (iv) serosa, constituída por tecido conjuntivo frouxo delimitado por um mesotélio. O intestino médio recebe inervação central por meio do ramo gastro-intestinal (rG) do nervo visceral comum (nV), enquanto que o intestino posterior foi innervado pelo nervo reto-anal (nR). A aplicação de marcações retrógradas com cloreto de cobalto acrescido de albumina sérica bovina, biocitina e *Horseradish peroxidase* no rG e no nR revelou que a maioria dos neurônios envolvidos no controle destes órgãos estão localizados no complexo ganglionar víscero-parietal. Ainda foi observada a presença de uma rede constituída por quatro gânglios (estomatogástrico, cárdico, gástrico e pilórico) interconectados por nervos e localizados sobre a parede do estômago, sendo denominado sistema nervoso estomatogástrico (SNEG). O traçamento anterógrado com *Lucifer Yellow* revelou que fibras oriundas do SNEG se projetam para os plexos entéricos, submucoso (PS) e mioentérico (PM), localizados entre as túnicas do tGI. A organização do sistema nervoso entérico (SNE) foi estudada com a aplicação das técnicas de impregnação argentafínica e coloração com azul de metileno. Os plexos entéricos mostraram-se formados por uma extensa rede de axônios e muitos somas neuronais, dispostos em pequenos grupos ou isoladamente. As fibras axonais que innervavam as células da camada muscular longitudinal no estômago eram organizadas em feixes e acompanhavam o comprimento das fibras musculares. O MP distribuía-se por toda a camada muscular circular e longitudinal. No estômago, a região cárdica apresentou um plexo mais denso do que a pilórica, contudo as

fibras nervosas dispunham-se entre e ao redor das fibras musculares de ambas as camadas. O plexo entérico no intestino apresentou o mesmo arranjo observado na região pilórica, sendo uniforme até o ânus. As duas tiflossoles intestinais, no pró-intestino, apresentaram grande quantidade de fibras nervosas, no entanto não foram observados somas neuronais. Dentre os constituintes do SNE foram observados células nervosas intra-epiteliais (*neuron like-intraepithelial cells*), que possuem dois tipos morfológicos: aberto (que projeta um cílio para o lúmen intestinal) e fechado (localizado na base do epitélio digestório) e células fusiformes, cuja morfologia e posição lembram as células intersticiais de Cajal. A neuroanatomia química do SNEG e do SNE foi analisada mediante a aplicação de técnicas de histoquímica e imunohistoquímica para diferentes mediadores e transmissores. No intestino médio e posterior foi observado um rico plexo com atividade acetilcolinesterásica (AChE), constituído por fibras oriundas do SNC, via nervos periféricos, e do SNEG. Neurônios e fibras nervosas entéricas mostraram-se esparsos na submucosa e entre as camadas musculares, circular e longitudinal, do estômago, intestino e reto. A atividade de diaforase da nicotinamida adenina dinucleotódeo fosfato (NADPHd) revelou neurônios e fibras nervosas com maior atividade em toda a túnica muscular do que na submucosa. A fluorescência induzida pelo ácido glioxílico (AG) revelou a maior presença de fibras nervosas e varicosidades catecolaminérgicas na submucosa do reto, pós-intestino e moela do que nas outras porções do tGI. A imunorreatividade à serotonina (5HT-ir) foi observada em somas e fibras nervosas distribuídas predominantemente na submucosa do reto e intestino, sendo encontrados poucos neurônios e fibras 5HT-ir no pró-ventrículo e moela. Os elementos nervosos FMRF-amida imunorreativos (FMRFa-ir) estavam presentes na mucosa, submucosa e muscular por toda extensão do intestino médio e posterior. As células nervosas intra-epiteliais foram mais marcadas pela AChE, 5HT-ir e FMRFa-ir do que pela NADPHd e seus processos se anastomosam formando um extenso e organizado plexo subepitelial. As células fusiformes tiveram os corpos e prolongamentos marcados pelos métodos aplicados, à exceção do AG. Uma intensa imunorreatividade a proteína fibrilar ácida glial (GFAP-ir) por todos os plexos do intestino médio e posterior e nos gânglios do SNEG, sugerindo uma importante função para as células gliais no SNP do tGI de gastrópodes. Assim, pode-se concluir que o controle do tGI no caracol *M. abbreviatus* possui um controle nervoso extrínseco direto, por meio dos gânglios subesofageais, via rG e nR, e indireto, pelo SNEG para o intestino médio, e uma inervação intrínseca, representada pelos plexos PS e PM, associados às células nervosas intra-epiteliais, que formam o plexo subepitelial tanto no intestino médio como no posterior. A neuroanatomia química permite inferir que, os diferentes transmissores analisados, podem exercer controle sobre a motilidade ou sobre as funções sensoriais e secretomotoras no tGI. Finalizando, a reação ao GFAP é uma evidência da presença de células enterogliais permitindo inferir que exista uma interação entre os constituintes dos plexos neurais com a glia, tal qual ocorre no SNC de gastrópodes e outros invertebrados.

ABSTRACT

PEREIRA, M. A. M. **Morphofunctional characterization of central and peripheral circuits that control the digestive activities of the snail *Megalobulimus abbreviatus***. Porto Alegre, 2012. 178p. Tese de Doutorado: Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Neurociências – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

The organization of the nervous system that controls digestive functions of gastropods mollusks has been studied relative to the constitution of the neuronal circuit underlying the deglutition rhythm. However, there is a lacuna in the knowledge about the organization of the peripheral nervous system regulating the medium and posterior segments of the digestive tract. However, there is a lacuna in the knowledge about the organization of the central (CNS) and peripheral nervous system (PNS) that regulates the medium and posterior segments of the digestive tract. The intermediate phylogenetic position attributed to the nervous system (NS) of the snail *Megalobulimus abbreviatus*, between Helicidae and basommatophoran species may constitute a via for understanding the control of the activity of the gastrointestinal (GI) tract of gastropods. Thus, the pulmonate snail *M. abbreviatus* was used in a morphological and neurochemical study that sought to describe the pattern of the central and peripheral innervation in an experimental model widely used in neurobiological research. Macroscopic anatomy revealed that the midgut was formed by the stomach, divided into pro-ventricle and gizzard, and intestine, divided into pro-intestine or tiflossolear, medium- and post-intestine, while the hindgut was formed by the rectum and anus. The light microscopy revealed that the GI wall was constituted by four tunics: (i) the mucosa was constituted by a intermittent ciliated columnar epithelium and lamina propria; (ii) the submucosa was a loose connective tissue, containing a system of haemocoelic spaces; (iii) the muscular was formed by the internal circular and external longitudinal layers, while in the gizzard there was a third muscular layer disposed obliquely and the cardia and pylorus regions contained two sphincters; (iv) the serosa display a loose connective tissue covered by a mesothelium. The midgut is innervated by the common visceral nerve, through gastrointestinal branch (Gb), while the hindgut is innervated by the rectum-anal nerve (Rn). Retrogradely backfilling with CoCl_2 added with 0.1% bovine albumin, byocitin and horseradish peroxidase from the Gb and Rn is employed to reveal the neurons innervating these digestive regions which are located in all ganglia within the viscera-parietal ganglia complex. Although we observed the presence of a network of four ganglia: stomatogastric, gastric, cardiac and pyloric, interconnected by nerves and located outer the surface of the stomach, which in the present study was referred to as the stomatogastric nervous system (STNS). Anterogradely labelin with Lucifer yellow which fibers of the STNS project to the submucous (SP) and myenteric plexuses (MP). The morphology of the enteric nervous system (ENS) was described using silver diammine impregnation and methylene blue staining. These plexuses were formed by extensive axonal networks and by several neuronal somata which are arranged in small clusters or as isolated cells. The axonal fibers innervating the longitudinal muscle cells in the stomach wall are organized in small bundles along the muscle length. The MP is distributed throughout the circular and longitudinal muscular layer. In the stomach, the cardiac area plexus is denser than the pyloric plexus, while the nervous fibers of both are located between and around

the muscular bundles. The enteric plexus in the intestine is a continuity of the pyloric arrangement, staying uniform until the anus. In both typhlosoles of the pro-intestine nerve bundles are found in large numbers but none neuron is observed. In addition to the plexus were observed were observed neuron-like intraepithelial cells, which possess two types: open (a cilium projecting into the intestinal lumen) and closed (located at the base of the digestive epithelium) and fusiform cells whose morphology and position resembling interstitial cells of Cajal. The chemical neuroanatomy of the STNS and SNE was analyzed by histochemistry and immunohistochemistry methods for different mediators and transmitters. In the midgut and hindgut, the plexus have a very intense AChE activity and it was constituted by fibers originated from the STNS or from the subesophageal complex through peripheral nerves. The enteric neurons and fibers with AChE activity were scattered in the submucosa and between the circular and longitudinal muscle layers of the stomach, intestine and rectum. Neuronal bodies and fibers with NADPHd activity are more abundant in the entire mass of smooth muscle elements than the submucosal layer. Fluorescent induced by GA revealed the presence of catecholaminergic nerve fibers and varicosities in the submucosal layer of the rectum, gizzard and post-intestine than in others organs of the GI. The immunoreactivity to serotonin (5HTir) elements was predominantly distributed in the submucosal layer of the intestine and rectum. Few 5HTir fibers was verify in the pro-ventricle and gizzard. The FMRFa-immunoreactive elements were present in the mucosal, submucosal and muscular layers throughout the mid and hindgut. The neuron-like intraepithelial cells were more labeled by AChE, 5HT and FMRFa than for NADPHd and their processes were organized forming a subepithelial plexus. The bodies and processes of the fusiform cells were labeled by the methods applied extensions, except for the GA. It was found an intense glial fibrillary acidic protein immunoreaction (GFAP-ir) were visualized, throughout the midgut and hindgut plexuses and in the ganglia of the STNS. This intense immunoreaction to GFAP in intramural plexuses suggests important roles to glial cells in the peripheral nervous system of digestive tract of this pulmonate snail. Therefore, the gastrointestinal tract is controlled directly by extrinsic innervation from the subesophageal ganglia or indirectly via STNS (for the midgut) and by an intrinsic innervation, represented by the MP and SP for both mid and hindgut. The data obtained from the neurochemical approaches utilized in the GI we infer that these different transmitter systems could exert putative roles in the motility or the secretomotor or sensorial functions of GI. Finally, as an evidence of the enteric glial cells, the neural constituents of the snail GI wall have a interaction with glia similar to have been described to invertebrate CNS represent a new approach to study of the ENS in gastropod and other invertebrates

1. INTRODUÇÃO

APRESENTAÇÃO DO TEMA

A neurobiologia comparada busca na simplicidade de organização dos invertebrados e vertebrados inferiores a compreensão dos circuitos comportamentais que regulam comportamentos ou rotinas básicas, que foram selecionadas ao longo da evolução por serem adaptativas. A abordagem comparativa, muito bem compilada por Bullock (1965; 1984), tem revelado que essas rotinas comportamentais básicas existentes, por exemplo, nos animais invertebrados podem integrar partes de comportamentos mais complexos nos vertebrados superiores (KATZ & HAMIS-WARRICK, 1999). A evolução determinou a diversidade dos repertórios comportamentais, que variam entre as espécies de forma ecologicamente apropriada, ou seja, sob pressões seletivas distintas. Circuitos de controle neurovisceral, entretanto, mostram maior conservadorismo filogenético, resultando em estratégias similares para o funcionamento de sistemas de órgãos de animais que compartilham habitats similares (BARRINGTON, 1974).

Dentre os invertebrados, os gastrópodes constituem modelos biológicos de suma importância para a compreensão de circuitos nervosos envolvidos no comportamento alimentar (revisões de: MURPHY, 2001; ELLIOTT & SUSSWEIN, 2002; CROPPER *et al.*, 2004), respiratório (revisão de TAYLOR & LUKOWIAK, 2000) e comportamento locomotor-resposta de fuga (revisão de BALABAN, 2002). Uma complexidade de tipo intermediário dos comportamentos apresentados por estes animais, a possível identificação individual de neurônios, seja pelo tamanho e neuroquímica (KANDEL, 2000; CHASE, 2002), ou pela alta especificidade no estabelecimento das conexões neuronais (WONG *et al.*, 1983), a importância dos moluscos consagrou-se no estudo de circuitos somáticos e neuroviscerais. Muitas questões atinentes a transmissão, interpretação e estocagem de informações no sistema nervoso de mamíferos foram sendo elucidadas com a utilização de gastrópodes em abordagens morfofisiológicas, dentre estas se destaca o conjunto dos experimentos sobre a memória não-associativa e associativa em *Aplysia*, que revelaram suas bases fisiológicas e permitiram o entendimento dos seus mecanismos de aquisição, consolidação e armazenamento e, inclusive, o reconhecimento de que estes processos são similares em mamíferos e comuns aos modelos animais já estudados (KANDEL *et al.*, 2000).

A porção do sistema nervoso que controla as funções digestivas dos gastrópodes tem sido mais estudada quanto à constituição dos circuitos neurais subjacentes ao ritmo de deglutição alimentar. Na literatura observa-se uma generalização sobre a inervação do sistema digestório (SD) de gastrópodes, onde os gânglios bucais inervam a região anterior, enquanto que o gânglio visceral inerva a região média e posterior do trato gastrointestinal (tGI, SCOTT, 1939; BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DORSETT, 1986; BULLOCK & RIDGWAY, 1995). A abordagem anatômica macroscópica, sem o traçamento de vias, revelou-se pouco conclusiva, uma vez que é comum em gastrópodes a descrição de neurônios de um gânglio emitirem seus axônios por nervos de outro gânglio (CHASE 2002).

A organização do sistema nervoso periférico que regula o segmento médio e posterior do tGI em gastrópodes ainda é controversa e, recentemente, teve seu interesse retomado. Alguns estudos existentes sobre o controle da motilidade intestinal foram realizados principalmente no opistobrânquio *Aplysia* (FUJISAWA *et al.*, 1999; FURUKAWA *et al.*, 2001; MORISHITA *et al.*, 2003; ITO & KUROKAWA, 2002; 2007). Contudo, considerando a diversidade de espécies que constituem a classe dos gastrópodes, cada vez mais se tornam necessários estudos que busquem compreender qual a organização e a função de nervos e neurônios relacionados ao tGI. Alguns destes componentes têm sido mencionados brevemente por diversos autores em suas descrições de um organismo ou órgão.

MORFOLOGIA DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES

A classe Gastropoda é o maior grupo de moluscos em termos de espécies e um dos poucos grupos de animais com sucesso para habitar diferentes ecossistemas: marinho, água doce e terrestre (BIELER, 1992). Considerando esta diversidade, uma análise das propriedades digestivas e da alimentação dependente do tipo da dieta não só pode elucidar condições morfológicas e fisiológicas específicas, mas pode muito bem contribuir para o conhecimento da organização filogenética que diz respeito às adaptações comportamentais (SALVINI-PLAWEN, 1981). Entretanto, a diversidade morfológica do SD é pouco considerada no estabelecimento dos critérios taxonômicos (HASZPRUNAR, 1988ab).

A estrutura geral do SD em gastrópodes foi amplamente revisada (HYMAN, 1967; RUNHAM & HUNTER; 1970; RUNHAM, 1975; SALVINI-PLAWEN, 1988). Em uma visão geral, o

SD em gastrópodes pode ser dividido em três segmentos: anterior (realiza a recepção, condução e estocagem temporária do alimento), médio (responsável pela digestão e absorção de nutrientes) e posterior (formação e eliminação das fezes). O trato digestivo anterior inclui a massa bucal, faringe, glândulas salivares, esôfago, parte do qual pode estar dilatado para constituir o papo. Anatomicamente o intestino médio é constituído pelo estômago e intestino, tendo em anexo a glândula digestiva, enquanto que o intestino posterior é representado pelo reto e ânus.

Microscopicamente também existem muitas diferenças sobre a organização tecidual da parede do SD em gastrópodes que, assim como a anatomia, foi amplamente revisada (CARRIKER & BILSTAD, 1946; HYMAN, 1967; PANIAGUA & NISTAL, 1983; LUCHTEL *et al.*, 1997; VOLTZOW, 1997; GOSLINER, 1997). Mesmo apresentando variações no formato de algumas porções, pode-se notar que existe um plano geral de estrutura no tGI, que segue um arranjo em camadas concêntricas e compostas por diferentes tecidos. Assim, a análise da parede do SD revela a presença de três a quatro túnicas que são: mucosa, submucosa, muscular e serosa. Grande parte da mucosa é formada por microvilosidades ou bordo em escova, provenientes de um grande epitélio colunar (COBB, 1969; PANIAGUA & NISTAL, 1983; LUCHTEL *et al.*, 1997; LOBO-da-CUNHA & BATISTA-PINTO, 2003 e 2005; ZAITSEVA, 2005). A grande variedade de tipos celulares constituindo a mucosa (células secretoras, entero-hepatócitos, vacuoladas e absorptivas), denota a versatilidade destes órgãos nos moluscos gastrópodes. É interessante salientar que estes mesmos tipos celulares também formam a mucosa do intestino (PANIAGUA & NISTAL, 1983; ZAITSEVA, 2005). A submucosa, por sua vez, é constituída por tecido conjuntivo frouxo e rico em espaços vasculares. A túnica muscular é formada por fibras orientadas circular e longitudinalmente, contudo pode ocorrer o acréscimo de mais camadas a este arranjo (HYMAN, 1967). Todos os órgãos do SD são envoltos por uma serosa, formada por tecido conjuntivo frouxo, delimitado por um mesotélio.

Os aspectos anatômicos e histológicos do SD serão apresentados em conjunto, considerando inicialmente aspectos comuns às subclasses Prosobranchia e Opisthobranchia. Contudo, como o escopo deste estudo baseia-se na espécie *Megalobulimus abbreviatus*, os aspectos inerentes a subclasse Pulmonata serão pontuados em separado.

PROSOBRANCHIA & OPISTOBRANCHIA

Em espécies inferiores de Prosobranchia (*Haliotis*, *Patella*, *Acmaea*, *Lottia*, entre outras) a cavidade bucal apresenta um par de bolsas laterais, enquanto que apêndices bucais desenvolvidos, usados na captura de presas, são encontrados em opistobrânquias pertencentes às famílias Clionidae e Pneumodermatidae (HYMAN, 1967). Membros da família Pyramidellidae, caracóis ectoparasitas, possuem um aparelho bucal desenvolvido, sendo anteriormente considerados como pertencente aos prosobrânquios (FRETTER & GRAHAM, 1949). Em Prosobranchia, a cavidade bucal apresenta um epitélio colunar não ciliado, que contém células mucosas PAS-positivas, recobertas por uma fina cutícula, que repousam parcialmente sobre uma membrana basal e fibras musculares longitudinais em uma matriz de tecido conjuntivo. Entremendo o epitélio são observadas glândulas unicelulares de secreção mucosa, as glândulas bucais (FRETTER & GRAHAM, 1949; 1962). No opistobrânquia *Elysia viridis*, Fretter (1941) descreveu que o epitélio ciliado apresenta três tipos diferentes de células granulares e que uma camada de fibras musculares dispostas circularmente e transversalmente sustentam esta camada. A camada muscular apresenta uma cavidade hemal, que é atravessada por uma fina camada de fibras musculares circulares, uma espessa camada de fibras longitudinais localizadas ventralmente e fibras musculares dispostas transversalmente.

A cavidade bucal é contínua com a faringe posteriormente, ocupada por uma massa ventral que constitui o aparato rádula, que possui um par de bolsas em prosobrânquios inferiores (*Haliotis*, *Patella*, *Acmaea*, *Lottia*, entre outros), em *Trochus* e taenioglossos (HYMAN, 1967). Frequentemente a parede dorsal da faringe pode conter um par de dobras com cílios longos que continuam ao longo do tGI. Em alguns sacoglossos (*Lobiger*, *Oxyone*, *Caliphyla* e *Thutidilla*) a faringe apresenta um apêndice saculiforme, também chamado de papo (HYMAN, 1967). A faringe, em ambos os grupos, mantém a mesma organização da cavidade bucal, apresentando um complicado arranjo muscular que ampara e suporta a rádula (HYMAN, 1967). Muitos opistobrânquios (Cephalaspidae, Acochilidiacea, Sacoglossa e alguns Nudibranchia) apresentam um par de mandíbulas no limite entre a cavidade bucal e a faríngea, de constituição semelhante à cutícula e um intrincado arranjo de fibras musculares circulares e longitudinais (CARRIKER, 1946; FRETTER & GRAHAM, 1949, 1962; HYMAN, 1967). Em *Marisa cornuaretis*, a mandíbula consiste em duas camadas, uma cutícula lamelar

superior e uma coluna inferior vertical (LUTFY & DEMIAN, 1967). Porém, nos Opisthobranchia as mandíbulas quitinosas apresentam pequenas projeções denticuladas ou poligonais (GOSLINER, 1997).

Frequentemente o esôfago apresenta uma expansão denominada papo, contudo em *Tonna* é descrito a presença de um ceco, enquanto que em *Haliotis* e *Patella* são encontradas bolsas esofageais (GRAHAM, 1932). Ainda, o esôfago pode ser dividido em três porções distintas: anterior (próximo a cavidade bucal), média (porção afetada pela torção) e posterior (ligação com o estômago) (GRAHAM, 1941; FRETTER & GRAHAM, 1962). Estes autores consideram que a torção no corpo dos Prosobranchia é refletida frequentemente pelo curso espiral das cintas longitudinais esofageais. Nos Opisthobranchia Cephalaspidea (*Philine*, *Scaphander* e *Haminoea*) são descritos dois papos, um anterior e outro posterior à moela (FRETTER & GRAHAM, 1939), que nestes animais é considerada como uma especialização do esôfago. Em Prosobranchia e Opisthobranchia, a mucosa esofageal é formada por um epitélio colunar ciliado, entremeado por células mucosas e glandulares, e por uma membrana basal de tecido conjuntivo e fibras musculares longitudinais, ainda está presente uma fina camada de fibras circulares compondo a parede do órgão (VOLTZOW, 1997; LOBO-da-CUNHA & BATISTA-PINTO, 2005). Em Prosobranchia a submucosa da porção média e posterior pode ser aglandular (FRETTER & GRAHAM, 1949, 1962), enquanto que em Opisthobranchia o epitélio é completamente glandular com muitas microvilosidades (LOBO-da-CUNHA & BATISTA-PINTO, 2005). Entretanto, o SD de *Plakobranhus ocellatus* possui células vacuoladas no epitélio da faringe, esôfago e reto, mas não no estômago e intestino (HIROSE, 2005). Ultra-estruturalmente em *Aplisya depilans*, os microvilos apresentam a extremidade dilatada e as células contêm invaginações da membrana e grande quantidade de vesículas, que sugerem atividade de endocitose e participação na captação de nutrientes (LOBO-da-CUNHA & BATISTA-PINTO, 2003, 2005). Ainda, a camada muscular pode estar aumentada constituindo uma moela, que apresenta dentes ou placas cuticularizadas no seu interior (HYMAN, 1967).

O intestino anterior de prosobrânquios é provido por um ou dois pares de glândulas salivares, que podem ser acompanhadas por glândulas acessórias bucais e faríngeais (GRAHAM, 1941; CARRIKER, 1943). No grupo Toxoglossa existe um sistema de injeção de veneno associado ao aparelho radular e às glândulas salivares (MARTOJA, 1960). Também

em opistobrânquios são encontrados dois pares de glândulas salivares, um bucal e outro faríngeo (HYMAN, 1967). Fretter e Graham (1962) descrevem uma grande diversidade no arranjo das glândulas salivares em prosobrânquios, que incluem os tipos acinar e tubular e que secretam ácidos, mucopolissacarídeos sulfatados, mucinas, glicoproteínas e enzimas. Algumas glândulas como em *Nucella lapillus*, podem conter uma bainha de tecido conjuntivo entremeado por algumas fibras musculares. Por outro lado, em opistobrânquios estas glândulas apresentam grande semelhança com as encontradas em prosobrânquios, sendo constituídas por células mucosas, ciliadas e glandulares com grandes massas de secreção (HYMAN, 1967).

A morfologia funcional do estômago em Prosobranchia é descrita detalhadamente por Graham (1985). O estômago apresenta-se como uma dilatação, mais ou menos pronunciado do tGI, estando totalmente embebido na massa visceral, podendo ser dividido em região cárdica, que recebe o esôfago e ductos da glândula digestiva, e pilórica, que continua-se como o intestino e, quando presente, o saco do estilete (*style sac*). Mackintosh (1925), assim como Alexander e Rae (1974) afirmam que existem três tipos de saco do estilete em opistobrânquios: livre no interior do intestino (*Nassarius obsoletus*); com as tiflosoles quase completamente fundidas de forma que o intestino e o saco se comunicam por uma fenda estreita (*Ilyanassa obsoleta*) ou este completamente fica separado do intestino (*Telescopium telescopium*). O estômago tende a ser reduzido em prosobrânquios carnívoros. Prosobrânquios inferiores possuem um pró-ventrículo, pequena região do estômago caracterizada por apresentar uma constrição no seu começo e outra no seu término (FRETTER & GRAHAM, 1962). O pró-ventrículo foi primeiramente descrito em *Lottia* (FISHER, 1904) e em *Patella*, *Cellana* e espécies similares (THIEM, 1917). *Pila*, *Haliotis*, *Tronchus* e *Pleurotomaria* apresentam um ceco gástrico, que pode ser uma simples evaginação ou uma espiral (HYMAN, 1967). Em *Aplysia* (Opistobranchia) o estômago também apresenta um ceco, entretanto a moela é considerada como uma porção separada deste órgão (HOWELLS, 1942). Ainda, em *Pteropoda*, o estômago muitas vezes não é definitivamente separado da glândula digestiva com o qual forma um grande saco (HYMAN, 1967).

Em Prosobranchia, Graham (1985) descreve que o interior do estômago é protegido por uma cutícula e que uma tiflosole maior se estende por todo o estômago até o intestino

e ápice do ceco espiralado. Ainda, observa que a tiflossole menor dirige-se ao saco do estilete, afirmando que as correntes ciliares das tiflossoles direcionam e misturam o suco digestivo ao alimento. Nas regiões descobertas pela cutícula encontra-se um epitélio colunar intermitente ciliado com microvilosidades, principalmente em *Littorina littoria* e *Nassarius obsoletus*, onde a cutícula é transparente (VOLTZOW, 1997). Abaixo do epitélio se localizam a membrana basal, camadas musculares, circular e longitudinal, e bandas de tecido conjuntivo, contendo células conjuntivas vesiculares, porosas e células depósitos de cálcio, invaginado entre os blocos musculares (VOLTZOW, 1997). Contudo, a parede do ceco gástrico possui dobras longitudinais recobertas por um epitélio não-ciliado, uma membrana basal e camada muscular semelhantes às presentes no esôfago. No saco do estilete é encontrado um epitélio colunar ciliado que se torna cuboidal ciliado (ALEXANDER & RAE, 1974). Um arranjo semelhante é descrito no estômago de opistobrânquios. Em *Aplysia punctata* e *Aplysia depilans*, Lobo-da-Cunha e Batista-Pinto (2003) observaram no epitélio gástrico células ciliadas e produtoras de muco, concordando com o descrito em *Philine aperta*, *Scaphander lignarius* e *Actoeon tornatilis* (FRETTER, 1939). Porém, em *Haminea hydatis* o epitélio apresenta maior complexidade, contando com outros tipos de células secretoras além das mucóides (FRETTER, 1939). Ainda, o ceco gástrico em *Aplysia* apresenta tiflossoles recobertas por um epitélio ciliado (HYMAN, 1967).

O intestino constitui a porção menos diferenciada do tGI, não sendo externamente delimitado do estômago em Prosobranchia. Em prosobrânquios inferiores pode constituir-se por voltas (*Haliotis*) ou bobinas ou "coils" (*Patella*), enquanto que nos superiores, geralmente corre em um curso mais ou menos em linha reta até o ânus (HYMAN, 1967). Frequentemente apresenta aproximadamente o mesmo diâmetro em toda sua extensão, mas pode ser regionalizado em um intestino delgado proximal e um intestino grosso distal (LUTFY & DEMIAN, 1967). O mesmo padrão é observado em Opistobranchia, contudo estes animais apresentam uma ou duas tiflossoles (HOWELLS, 1942). A porção inicial do intestino em Prosobranchia possui tiflossoles, enquanto que as demais porções não apresentam estas estruturas, a mucosa é semelhante à encontrada no estômago, contudo a borda em escova é mais evidente e não está presente a camada muscular longitudinal (VOLTZOW, 1997). Em *Marisa cornuarietis* foram observadas células absorptivas na mucosa do intestino e reto (LUTFY & DEMIAN, 1967). Hyman (1967), citando vários estudos em opistobrânquios,

descreve que a parede do intestino é muito fina e o epitélio ciliado varia de cuboidal a cilíndrico, sendo interposto por mucócitos e células caliciformes. Ainda observa que a mucosa repousa sobre uma fina camada de tecido conjuntivo, que por sua vez é recoberta por uma muscular circular.

O intestino posterior é formado pelo reto e ânus, que mantém o mesmo padrão do intestino em gastrópodes. O reto mantém o mesmo padrão de estrutura, entretanto em *Diodora mamillata* a camada muscular apresenta uma camada muscular circular interna, enquanto que a externa possui fibras longitudinais e oblíquas (GABE, 1951). Brough e White (1990) ao estudarem a ultra-estrutura do reto em *Littorina saxatilis* descobriram que o epitélio apresenta-se pregueado e tem característica secretora contendo vários corpúsculos de inclusão. Ainda, descrevem um grande número de espaços vasculares na mucosa. Já em Opisthobranchia, a porção final do intestino apresenta glândulas retais e anais (HYMAN, 1967).

PULMONATA

Existe um grande volume de informação sobre a estrutura e função do SD de gastrópodes pulmonados. A morfologia do tGI é conhecida em um grande número de táxons, como resultado da investigação taxonômica e sistemática, mas estudos especificamente sobre as questões da estrutura e da função digestiva são em número reduzido (DIMITRIADIS, 2001).

O SD nestes animais possui muitos fatores estruturais em comum, porém variações significativas são observadas em decorrência da espécie, dieta e desenvolvimento. Se compararmos o intestino de herbívoros e carnívoros, estes possuem um intestino reduzido em comprimento e de menor complexidade. Ou, ainda, se observada a tendência evolutiva que resulta na redução e/ou supressão completa da concha, resultando em última análise nas lesmas, esta tem sido acompanhada por mudanças variadas e distintas na organização do trato digestivo (TILLIER, 1984).

A porção anterior do SD em Pulmonata varia significativamente entre as espécies, contudo existe uma organização básica, que remete em muitas semelhanças aos opistobrânquios e prosobrânquios. Nos pulmonados, a boca geralmente leva diretamente para a faringe, sem a intervenção de uma cavidade bucal, que quando presente é muito

pequena, sendo o teto da entrada marcado por uma papila em membros terrestre (HYMAN, 1967). A parede da cavidade bucal em gastrópodes pulmonados é recoberta por um epitélio cuticularizado que se continua com as estruturas do aparelho radular e faringe, apresentando glândulas bucais localizadas bilateralmente (LUCHEL *et al.*, 1997). Uma mandíbula quitinosa delimita a entrada da faringe em *Gadinia* e *Amphibola* (HYMAN, 1967). Em *Lymnaea*, *Australorbis* (= *Biomphalaria*) e *Chilina* a mandíbula é formada por duas peças, uma lateral e outra média (HYMAN, 1967). Imediatamente após a mandíbula encontra-se o bulbo bucal com o aparelho radular ou odontóforo.

O esôfago parte do teto da faringe, geralmente do ponto onde se abrem os ductos das glândulas salivares, sendo um tubo delgado e apresentando estrias longitudinais no seu interior (MORTON, 1955a; HYMAN, 1967). O esôfago apresenta uma região de estocagem de alimentos, o papo que em estilomatóforos é descrito como o local de início da digestão (LUTCHEL *et al.*, 1997). Em estilomatóforos em geral o esôfago é curto, mas o papo é mais proeminente. Por exemplo, em *Achatina fulica* o papo é dividido em câmaras anterior e posterior, por um esfíncter que controla o fluxo de alimentos (GHOSE, 1963). Bonfatti (1980) descreve que o esôfago em *Megalobulimus* possui uma porção anterior e outra posterior e que o papo está localizado entre estas porções. A parede esofageal é constituída por um epitélio cilíndrico ciliado, uma camada de tecido conjuntivo e uma dupla camada de fibras musculares, dispostas circular e longitudinalmente (HYMAN, 1967). Estudos ultra-estruturais demonstram que as células da mucosa são de três tipos: ciliadas, não ciliada com microvilosidades e glandulares, que se mantém por toda a extensão do tGI (CARRIKER & BILSTALD, 1946; BOER & KITS, 1990). Tanto as células ciliadas como as com microvilosidades apresentam grande quantidade de grânulos apicais, indicando grande atividade de endocitose (BOER & KITS, 1990). No pró-esôfago as células ciliadas são mais freqüentes, sendo em menor quantidade no papo, enquanto que a distribuição das células com microvilosidades é inversa. As células com microvilosidade no pós-esôfago contêm depósitos de glicogênio, lipídeos e proteínas (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988).

Em *Lymnaea stagnalis*, Carriker e Bilstald (1946) demonstram que a região anterior do esôfago apresenta um epitélio somente ciliado, enquanto que na região posterior além de ciliado o epitélio é secretor, com grande quantidade de células glandulares. Já o epitélio do papo além das células cilíndricas ciliadas apresenta células caliciformes, mucócitos ou grupos de glândulas subepiteliais. Porém, em *Helix lucorum* o epitélio ciliado está presente

em todo o órgão (DIMITRIADIS, 2001) e em *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988) o epitélio ciliado está presente somente na porção inicial do esôfago e as células apresentam microvilos. Células ciliadas com microvilosidades e mucócitos estão presentes em todo tGI, com exceção do papo em *Deroceras reticulatum* (TRIEBSKORN, 1989). Já em *Megalobulimus* é descrito que a mucosa é pregueada e com vilosidades (BONFATTI, 1980). No entanto, em Limacoidea e Milacidae o epitélio do terço anterior do esôfago possui uma cutícula, enquanto que o restante é intermitente ciliado com microvilos, sendo que no papo são encontradas apenas células não ciliadas e mucócitos (LEAL-ZANCHET, 1998).

O estômago em gastrópodes pulmonados é descrito como uma grande dilatação do intestino médio, de aspecto esférico e totalmente envolto pela massa da glândula digestiva (SCOTT, 1939). Uma estrutura tubular dilatado em forma de U foi descrito em *Otina otis* (MORTON, 1955b), *Amphibola*, *Giadina* (HYMAN, 1967), *Phyllocaulis soleiformis* (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990) e *Bradybaena similis* (THOMÉ *et al.*, 1996). Em pulmonados, o pró-ventrículo é descrito em *Onchidella* (FRETTER, 1943), *Otina* (MORTON, 1955b) e *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988), entre outros. Entretanto, Kürkenthal *et al.* (1969) descreve o estômago como fusiforme e alongado em *Helix pomatia*, estando mais relacionado às glândulas salivares do que com o intestino. Em pulmonados de água doce (Basommatophora) o estômago é parcial ou totalmente muscularizado para formar uma moela (MORTON, 1955b; FRETTER, 1943), assim como em algumas espécies de Stylommatophora (DIMITRIADIS, 2001). O estômago possui uma papila em *Strophocheilus miersi* (PENA *et al.*, 2004), sendo comum a presença de ceco em *Otina* e *Giadina* (MORTON, 1955b, HYMAN, 1967) ou de tiflossoles gástricas, como descrito em *Phyllocaulis soleiformis* (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990). Em Systellomatophora, a porção final do estômago, piloro, é descrita como parte do intestino e denominada de intestino tiflossolear (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990), contudo em outros pulmonados constitui uma porção do estômago (SCOTT, 1939; CARRIKER & BILSTAD, 1946; RIGBY, 1962; LUFTY & DEMIAN, 1967).

A estrutura da parede do estômago reflete a funcionalidade deste órgão. Os animais que possuem um estômago simples, apenas glandular, como *Achatina fulica* (GHOSE, 1963), *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988), *Deroceras reticulatum* (TRIEBSKORN, 1989) e os do gênero *Helix* (GUARDOBASSI & FERRERI, 1953; DIMITRIADIS *et al.*, 1992), apresentam um epitélio cilíndrico intermitente ciliado e células secretoras de muco. Porém, os que possuem um estômago composto, uma porção glandular e uma muscular, como

Phyllocaulis soleiformis (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990) apresentam um epitélio intermitente ciliado na primeira e intermitente ciliado, podendo ser não ciliado e recoberto por uma cutícula na segunda porção (HYMAN, 1967). Ainda, as espécies *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988) e *Deroceras reticulatum* (WALKER, 1969; TRIEBSKORN, 1989) apresentam predomínio das células epiteliais não ciliadas sobre as ciliadas. Em algumas espécies, como por exemplo, *Lymnaea stagnalis* (CARRIKER & BILSTALD, 1946), *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988) e *Phyllocaulis soleiformis* (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990), o estômago apresenta duas tiflosoles, uma maior e outra menor recobertas por um epitélio cilíndrico ciliado. A região pilórica do estômago constitui-se de um epitélio intermitente ciliado com muitas células glandulares, que pode ser uma continuação da cobertura das tiflosoles (CARRIKER & BILSTALD, 1946, LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990).

Morton (1955a) descreve que *Otina* apresenta um dos mais antigos tGI entre os pulmonados e que a porção muscular do estômago pode atuar como uma moela. O estômago muscular ou moela, presente em Basommatophara, é caracterizado por uma grande quantidade de fibras musculares dispostas em camadas de arranjo circular, longitudinal e oblíqua (HYMAN, 1967). Carriker e Bilstad (1946) descrevem que este órgão em *Lymnaea* possui um par de almofadas musculares laterais alternados por fibras musculares verticais e longitudinais unidos por tendões. Entretanto, *Ancylus* e *Acroloxus* possuem quatro camadas dispostas longitudinalmente e cinco circularmente, *Physa* e *Myxa* apresentam quatro camadas de cada arranjo, enquanto que *Planorbis* apresenta oito camadas de cada (HYMAN, 1967). Nas espécies que apresentam um ceco gástrico, o epitélio nesta porção é constituído por células ciliadas estreitas entremeadas por células basofílicas, apresentando cintas longitudinais no seu interior (CARRIKER & BILSTAD, 1946).

O intestino em pulmonados pode ser diferenciado em quatro regiões: pró, médio e pós-intestino e reto, sendo curto em animais carnívoros e longo, além de muitas vezes enrolado ou em espiral em herbívoros (HYMAN, 1967; LUCHTEL *et al.*, 1997; DIMITRIADIS, 2001). O pró-intestino e o médio-intestino são caracterizados em algumas espécies devido as duas tiflosoles, que podem ser de mesmo tamanho, onde uma pode ser originada a partir daquela existente no estômago e que terminam em uma válvula tiflosolear (SCOTT, 1939; HYMAN, 1967; DIMITRIADIS, 2001). Contudo, Leal-Zanchet *et al.* (1998) consideram que o intestino tiflosolear é a porção pilórica do estômago e que o intestino diferencia-se em regiões anterior, média e posterior em *Phyllocaulis soleiformis*. Em Limacoidea e Milacidae o

intestino apresenta quatro porções distintas: tiflossolear, anterior, média e posterior (LEAL-ZANCHET, 1998). Enquanto que em *Helix pomatia* (KÜRKENTHAL *et. al.*, 1969) não são observadas tiflossoles no intestino, que apresenta três porções: anterior, média e posterior. Em *Theba pisana* a porção média do intestino diferencia-se da anterior por não apresentar tiflossoles (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988). A principal diferença em relação ao pró-intestino, encontrada entre as diferentes espécies de pulmonados está na ausência ou presença de ceco em algumas espécies (LUCHEL *et al.*, 1997). O ceco está presente apenas em Limacoidea e Milacidae (HYMAN, 1967; LEAL-ZANCHET, 1998). O pós-intestino difere do reto devido uma diminuição no diâmetro e por o segundo frequentemente apresentar tênias de tecido muscular e em alguns casos um ceco (GHOSE, 1963; HYMAN, 1967, ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988).

Ao revisar a constituição da parede do intestino, Hyman (1967) conclui que o epitélio intestinal é ciliado, interposto por mucócitos ou por ductos de glândulas mucosas subepiteliais, sustentadas por tecido conjuntivo e por duas camadas de músculo em arranjo longitudinal e circular. Contudo, três regiões histológicas distintas são observadas no intestino de *Deroceras reticulatum* (WALKER, 1969; TRIEBSKORN, 1989) e *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988). Nestes animais o epitélio do pró-intestino é ricamente ciliado, contudo células não ciliadas também são encontradas, além de células glandulares interpostas entre os dois tipos. Estas células glandulares são de dois tipos, semelhante aos mucócitos do esôfago e outra denominada basofílica, devido à grande concentração de grânulos. Já nas porções média e posterior e no reto são observadas células ciliadas, não ciliadas e mucócitos granulares e vacuolizados. Abaixo do epitélio encontra-se uma camada de tecido conjuntivo e uma fina camada de músculo liso disposta circularmente. Observações descritas por Ghose (1963) no intestino de *Achatina fulica* mostram que a mucosa forma pregas, as células epiteliais são alongadas e não possuem cílios, a submucosa é constituída por um tecido conjuntivo areolar com algumas fibras musculares e a camada muscular possui arranjo longitudinal e circular. No reto destes animais, o epitélio é colunar ciliado, apresentando células curtas, nas regiões das pregas, e longas, no restante do órgão; a submucosa areolar não apresenta fibras musculares, enquanto que a muscular longitudinal apresenta um plano convexo em separado da muscular circular.

Franchini e Ottaviani (1992) descrevem três tipos celulares no epitélio de *Planorbarius corneus*: células colunares ciliadas e não-ciliadas, mucócitos e células glandulares, que são sustentadas por uma fina membrana basal. As células colunares do epitélio nas diferentes porções do intestino de *Lymnaea* apresentam microvilos, que contêm rosetas de glicogênio, gotículas de gordura e corpos para-cristalinos, assim como as células glandulares (BOER & KITS, 1990). Em *Limacoidea* e *Milacidae* (LEAL-ZANCHET, 1998) a primeira região do intestino possui um epitélio colunar ciliado com aparência pseudoestratificada, devido à posição dos núcleos das células mucosas. Na porção secundária e terciária são observadas tanto células ciliadas como não ciliadas associadas às células secretoras, mucosas e glandulares, enquanto que a quarta porção do intestino e o reto são revestidos por um epitélio escamoso a cuboidal não ciliado, exceto em uma região delimitada longitudinalmente, associado a células glandulares. As camadas subepiteliais são compostas por uma fina camada de tecido conjuntivo e uma dupla camada de músculo liso, longitudinal interna e circular externa. As regiões, anterior e média, do intestino de *Phyllocaulis soleiformis* apresentam semelhança com o descrito para *Limacoidea* e *Milacidea*, entretanto a porção posterior apresenta células epiteliais ciliadas e células glandulares subepiteliais enquanto que o reto apresenta um epitélio que varia entre cilíndrico a cúbico baixo ciliado com células mucosas (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990). Em *Ariolimax columbianus* o epitélio do reto é colunar alto com interdigitações basolaterais, características comuns a um epitélio de transporte e a habilidade de manter o gradiente de osmolaridade através da parede da víscera (LUCHEL *et al.*, 1997).

CONTROLE NERVOSO DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES

Nos últimos 30 anos, muitos grupos de pesquisa tem examinado os circuitos que controlam o comportamento alimentar e o trânsito dos alimentos no tGI, buscando compreender as propriedades do sistema nervoso que controlam o SD de gastrópodes. Nestes estudos, novas informações sobre as características celulares bem como das redes nervosas neuronais são sistematicamente interpretadas à luz da experiência de descobertas anteriores sobre o controle do SD.

A alimentação tem sido estudada em gastrópodes carnívoros e herbívoros. Muitos aspectos da alimentação em ambos herbívoros e carnívoros será discutido, embora a ênfase

seja colocada em herbívoros, particularmente *Aplysia* e *Lymnaea*. Estes dois gêneros vêm sendo estudados por muitos pesquisadores mais do que os outros gastrópodes e, conseqüentemente, há muitas publicações mais recentes sobre estes moluscos (MURPHY, 2001; ELLIOTT & SUSSWEIN, 2002; CROPPER *et al.*, 2004).

Sumarizando estes estudos, o controle das funções digestórias em gastrópodes apresenta dois níveis de atividade: extrínseca, representado pelos gânglios centrais cerebrais, bucais e subesofageais e, em algumas espécies, por gânglios periféricos, o sistema nervoso estomatogástrico (SNEG); e intrínseca, caracterizada pela presença de um sistema nervoso entérico (SNE), formado pelos plexos submucoso e mioentérico. No entanto, considerando a diversidade inerente aos gastrópodes, esta sumarização representa uma temeridade, sendo necessárias observações mais aprofundadas sobre estes dois níveis de controle nervoso do SD nestes animais.

INERVAÇÃO EXTRÍNSECA DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASRÓPODES

A organização macro e microscópica do sistema nervoso central (SNC) de gastrópodes foi amplamente revisada por Bullock e Horridge (1965), Hyman (1967) e Bulloch e Ridgway (1995). O SNC caracteriza-se por um agregado de gânglios localizados ao redor da porção anterior do SD, que constitui o anel periesofageal, onde são observados três pares constantes de gânglios cerebrais, pleurais e pedais. Ainda, unidos ao gânglio cerebral por um conectivo e localizados junto à parede látero-posterior da rádula estão os dois gânglios bucais. Em Prosobranchia, mais ou menos distantes do anel localizam-se os gânglios ímpares supra-intestinal, sub-intestinal e visceral ou abdominal, no entanto em Opisthobranchia os gânglios supra e sub-intestinal são algumas vezes chamados de parietais e podem estar muito próximos aos gânglios pleurais. Em Pulmonata os gânglios ímpares passam a constituir a porção ventral do anel periesofageal, onde o gânglio supra-intestinal passa a constituir o gânglio parietal direito, enquanto que o subintestinal constitui o parietal esquerdo. Os gânglios cerebrais comunicam-se com a porção ventral do anel por meio de dois pares de conectivos, cérebro-pedais e cérebro-pleurais (**Fig. 1**).

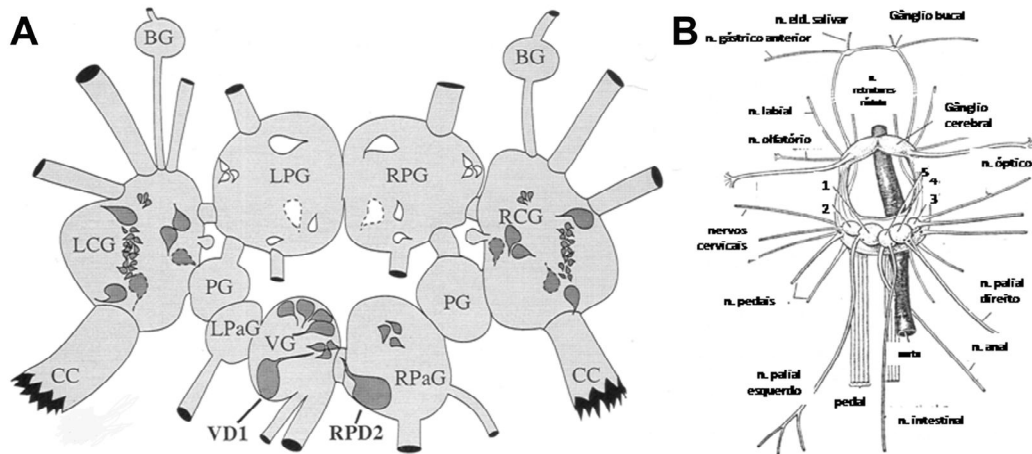


Figura 1. Esquemática da organização do SNC em gastrópodes pulmonados. **A.** Representação esquemática da organização geral e da localização dos neurônios VD1 e RPD2 em *Lymnaea stagnalis*. O esquema representa um plano do SNC, onde a comissura cerebral (CC) foi seccionada e os gânglios cerebrais foram deslocados, sendo indicados: LCG- gânglio cerebral esquerdo; RCG - gânglio cerebral direito, LPG – gânglio pedal esquerdo, BG – gânglios bucais; RPG - gânglio pedal direito; PG – gânglios pleurais; LPaG- gânglio parietal esquerdo; RPaG - gânglio pedal direito; VG – gânglio visceral. Nesta vista, os neurônios dorsais foram indicados pelas linhas contínuas, enquanto que os ventrais foram indicados pelas linhas tracejadas. Neurônios da classe 1 (VD1 e RPD2) foram identificados, enquanto que os de classe 2 foram representados pelas células escuras e os da classe 3 pelas células brancas (KERKHOVEN *et al.*, 1992). **B.** Esquemática do SNC e principais nervos em *Helix pomatia*, indicando: 1- gânglio parietal esquerdo; 2- gânglio pleural esquerdo; 3- gânglio pleural direito; 4- gânglio parietal direito; 5- gânglio visceral (cedido por G. Kerkut, citado por BULLOCK & HORRIDGE, 1965).

O meio interno, em gastrópodes, tem grande parte do seu controle atribuído aos gânglios parietal e visceral, que diretamente ou indiretamente, via gânglios periféricos ou plexos nervosos, regulam as atividades viscerais (CHASE, 2002). Muitos dos circuitos centrais que regulam o funcionamento visceral foram estudados em *Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis* e *Achatina fulica*, entretanto estes estudos referem-se ao controle exercido sobre os circuitos cardíaco-respiratório, renal e reprodutivo (BAGUST *et al.*, 1979; PIN & GOLA, 1984; VEHOVSZKY & ELEKES, 1985; RÓZSA, 1987; S-RÓZSA & ZHURAVLEV, 1981; S-RÓZSA, 1987; FURUKAWA & KOBAYASHI, 1897ab; BUCKETT *et al.*, 1990a,b; SYED *et al.*, 1990, 1991; ZHURAVLEV *et al.*, 1997, 2002; ANTKOWIAK & CHASE, 2003). Sobre o controle nervoso do

tGI a grande maioria dos estudos abordam os circuitos adjacentes à fase inicial do comportamento alimentar (MURPHY, 2001; CHASE, 2002; ELLIOTT & SUSSWEIN, 2002), que serão considerados a seguir.

INERVAÇÃO CENTRAL

Movimentos para encontrar alimentos são frequentemente realizados por músculos da cabeça e dos pés, que também produzem outros alheios à alimentação. Em gastrópodes herbívoros, depois dos alimentos serem localizados estes são ingeridos por movimentos cíclicos da rádula (CHASE, 2002; ELLIOTT & SUSSWEIN, 2002). Em contrapartida, moluscos carnívoros capturam suas presas através de órgãos especializados que podem ser adaptações de estruturas presentes nos herbívoros (por exemplo, a faringe em *Pleurobranchaea*) ou que podem estar relacionados com tais estruturas (por exemplo, cones bucais em *Clione*) (DAVIS & MPITSOS, 1971; HERMANS & SATTERLIE, 1992). A massa bucal é inervada pelos gânglios bucais, que se conectam ao gânglio cerebral (ou aos gânglios fundidos cerebro-pleural em *Pleurobranchaea*) pelos conectivos cérebro-bucais (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DORSETT, 1986; BULLOCK & RIDGWAY, 1995). O gânglio cerebral inerva muitas estruturas relacionadas à alimentação (pé rostral, a cabeça, os tentáculos sensoriais, anterior e posterior [*rhinophores*], os lábios e a boca) e os músculos extrínsecos bucais, que ocasionam os movimentos da massa bucal. Estes gânglios modulam a atividade dos gânglios bucais e subesofageais (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DORSETT, 1986; BULLOCK & RIDGWAY, 1995).

Os circuitos neuronais que controlam a fase apetitiva e consumatória são produzidos por motoneurônios dos gânglios cerebral, pedal e pleural (BABLANIAN *et al.*, 1987), onde a estimulação intracelular do neurônio C-PR excita motoneurônios bucais polisinápticamente, mas em alguns casos monosinápticamente (NAGAHAMA *et al.*, 1993, 1994). No entanto, em *Helix* a estimulação dos dois nervos peritentaculares direcionam os tentáculos para o alimento (PESCHEL *et al.*, 1996). Neurônios de comando cerebrais (NCC) quando excitados ativam neurônios bucais gerando o ritmo cíclico da fase consumatória (ROSEN *et al.*, 1991; SANCHEZ & KIRK, 2000). Os NCC recebem diferentes denominações: neurônios para-cerebrais (*Pleurobranchaea*, GILLETTE *et al.*, 1978), célula cerebral ventral 1 (CV1, *Lymnaea*, MCCROHAN, 1984), células cérebro-bucais (CB, *Limax*, DELANEY & GELPERIN, 1990) ou

interneurônios cérebro-bucais (ICB, *Aplysia*, ROSEN *et al.*, 1991). Contudo, os NCC constituem uma população heterogênea, sendo ineficazes para estimular os movimentos sozinhos (HURWITZ *et al.*, 1999b; KOVAC *et al.*, 1983; McCLELLAN, 1983a; McCROHAN & CROLL, 1997; XIN *et al.*, 1999), sendo necessárias diferentes combinações de ICBs ou de neurônios bucais para que ocorra a geração do ritmo cíclico (GILLETTE *et al.*, 1978; McCLELLAN 1983a; DAVIS *et al.*, 1984; CHIEL *et al.*, 1988; XIN *et al.*, 1999). Assim, o padrão rítmico dos movimentos apetitivos e consumatórios são gerados por interneurônios do gânglio bucal.

Em *Lymnaea*, *Planorbis* e *Helisoma*, foram identificadas anatômica e fisiologicamente três classes de interneurônios geradores centrais de padrão (GCP, denominados N1, N2 e N3) (ROSE & BENJAMIN, 1981b; ELLIOTT & BENJAMIN, 1985a; ARSHAVSKY *et al.*, 1988abc; QUINLAN *et al.*, 1995; 1997; QUINLAN & MURPHY, 1996; BRIERLEY *et al.*, 1997b; MURPHY, 2001). A atividade de cada célula N está limitada a disparos de potenciais de ação em uma fase do padrão rítmico (recrutamento seletivo), excitando motoneurônios quimicamente e eletrotonicamente (ELLIOTT & BENJAMIN, 1985a; BRIERLEY *et al.*, 1997b; VEHOVSZKY & ELLIOTT, 2001). Por exemplo, no GCP de *Lymnaea*, o N1 (protração) excita fracamente o N2 (grosa), até que o N2 dispare plenamente inibindo N1 e termine a protração (ELLIOTT & BENJAMIN, 1985a; BRIERLEY *et al.*, 1997b). Interneurônios com propriedades semelhantes são encontrados em *Aplysia*, *Planorbis* e *Helisoma* permitindo a comunicação do gânglio bucal para o cerebral, ocasionando movimentos cíclicos nos órgãos efetores controlados por ambos (ARSHAVSKY *et al.*, 1988b;. ELLIOTT e KEMENES, 1992; HURWITZ *et al.*, 1994, 1997). Em *Pleurobranchaea*, circuitos oscilatórios independentes estão presentes nos gânglios cérebro-pleural e bucal, pois cada um é capaz de responder fasicamente à estimulação tônica do nervo (DAVIS *et al.*, 1973). Contudo, estudos posteriores indicaram que os disparos fásicos no cérebro são gerados na ausência de um oscilador em separado, confirmando a presença de um segundo oscilador (COHAN & MPITSOS, 1983; DAVIS *et al.*, 1984;. LONDON & GILLETTE, 1984ab). Osciladores acoplados também estão presentes nos gânglios cerebrais de *Aplysia* e *Lymnaea* (PERRINS & WEISS, 1996).

Muitos neurônios no circuito alimentar parecem ter múltiplas funções, assim como em vários outros circuitos de invertebrados. No entanto, a ênfase de moluscos em estudos paralelos sobre o comportamento e sobre o sistema nervoso, permitiu que os investigadores

compreendessem essas funções em um detalhe que não está disponível em outros sistemas. O neurônio B21 em *Aplysia* é um exemplo de célula multi-funcional, atuando como um mecanoreceptor que responde ao toque do alimento na rádula (MILLER *et al.*, 1994), como um receptor elétrico e químico para GCP e motoneurônios (ROSEN *et al.*, 2000b) ou como proprioceptor durante a fase de retração (BOROVIKOV *et al.*, 2000). Outros, como por exemplo, B31/B32 combinam funções de interneurônio e de motoneurônio, onde o soma atua como parte do GCP, enquanto que o axônio conduz um músculo a fase de protração (HURWITZ *et al.*, 1994).

Como em outros sistemas (MARDER & CALABRESE, 1996), um único GCP pode dar origem a dois padrões quantitativa e qualitativamente diferentes de atividade, permitindo examinar em detalhe a relação entre as propriedades celulares, o circuito e os comportamentos produzidos. No gânglio bucal de *Aplysia*, *Lymnaea*, *Helisoma* e *Pleurobranchaea*, um único GCP gera vários padrões de atividade (MURPHY, 2001), que podem ser correlacionados com a expressão de diferentes padrões comportamentais (CROLL & DAVIS, 1981, 1982; HURWITZ *et al.*, 1996; McCLELLAN, 1982ab; MORTON & CHIEL, 1993ab). Estudos com diferentes gastrópodes mostram que a escolha entre os comportamentos é determinada pelo recrutamento de diferentes combinações de NCC (QUINLAN & MURPHY, 1996; XIN *et al.*, 1999). Por exemplo, o estímulo intracelular em ICB-2 e ICB-12 provocam salvas de atividade cíclica repetitiva no ato de morder (CHURCH & LLOYD, 1994; HURWITZ *et al.*, 1999b), enquanto que a estimulação do ICB-1 induz a rejeição (ROSEN *et al.*, 2000a). No entanto, a estimulação das células paracerebral e da célula ventral branca no gânglio bucal de *Pleurobranchaea* inicia padrões de atividade que são correlatos de diferentes movimentos (GILLETTE & GILLETTE, 1983; McCLELLAN, 1983ab; CROLL *et al.*, 1985bc). Enquanto que o neurônio B34 dispara apenas em alguns movimentos da protração resultando em rejeição (HURWITZ *et al.*, 1997), a excitação do B51, típico de alguns movimentos da retração, resulta em movimentos semelhantes à ingestão (NARGEOT *et al.*, 1999b) ou do ato de engolir (EVANS & CROPPER, 1998).

Um mecanismo que contribui para a escolha entre os vários movimentos é a modulação por diferentes transmissores (KABOTYANSKI *et al.*, 2000). O alimento inicia um estado de excitação mediado por conexões modulatórias lentas entre os neurônios, promovendo os movimentos típicos do comportamento alimentar (KUPFERMANN, 1974;

KUPFERMANN *et al.*, 1991). Os neurônios gigantes serotoninérgicos são os moduladores deste processo, constituindo células presentes em todos os gastrópodes, sendo identificados por várias siglas, MCC, MCG, CGC, em diferentes espécies (KUPFERMANN & WEISS, 1982), cujas projeções axonais são direcionadas ao gânglio e aos músculos bucais (KUPFERMANN *et al.*, 1991). Em *Lymnaea*, por exemplo, a estimulação das células cerebrais serotoninérgicas ativa o padrão, acelerando ou reduzindo a taxa de alimentação, dependendo do estado do sistema (McCROHAN & AUDESIRK, 1987; TUERSLEY & McCROHAN, 1988). Assim, a serotonina (5HT) modula os mecanorreceptores, os músculos da protração e retração e motoneurônios que inervam a rádula, ocasionando retardo na retração e diminuição na força dos movimentos radulares, mas não afetam a latência para morder (WEISS *et al.*, 1978; McCROHAN e BENJAMIN, 1980ab; ROSEN *et al.*, 1989; YEOMAN *et al.*, 1994a, 1996; ALEXEEVA *et al.*, 1998), enquanto que a injeção de 5-6-hidroxitriptamina reduziu a latência para alimentação destes animais após 12-18 dias, num momento em que os níveis de 5HT também foram reduzidos (KEMENES *et al.*, 1990). Em contraste com os efeitos em herbívoros, a estimulação do MCG em *Pleurobranchaea* acelerou o ritmo de alimentação contínua, ocasionando uma curta latência na eferência motora deste NCC (GILLETTE & DAVIS, 1977). Os interneurônios bucais octopaminérgicos (OC) aceleram os ritmos e promovem a estabilidade de determinados padrões rítmicos ou reconfiguram o padrão alimentar, através de sua rede de conexões com os interneurônios e outros motoneurônios. Sua eferência para SO, um interneurônio modulador colinérgico, também localizado no gânglio bucal, permite que a estimulação dos interneurônios OCs reproduzam um ciclo fictício de alimentação após o fim do estímulo (ELLIOTT & VEHOVSZKY, 2000; VEHOVSZKY & ELLIOTT, 2001). Muitos de seus efeitos são policíclicos, ou seja, duram mais se o padrão alimentar se repete.

A inibição da alimentação ocorre por estímulos mecânicos que resultam do preenchimento do estômago ou intestino com alimentos, que atuam inibindo o GCP e ativam os motoneurônios retratores da rádula (DAVIS & GILLETTE, 1978; SUSSWEIN & KUPFERMANN, 1975ab; SUSSWEIN *et al.*, 1976; REINGOLD e GELPERIN, 1980; KUSLANSKY *et al.*, 1987; ELLIOTT & BENJAMIN, 1989). Contudo na *Aplysia*, o consumo de pequenas quantidades de alimentos gera estímulos vindos do intestino que retardam a inibição do

consumo, permitindo encher o intestino com maior quantidade de alimento (SUSSWEIN *et al.*, 1984b).

As porções média e posterior do tGI em gastrópodes são inervadas por neurônios localizados no chamado complexo víscero-parietal (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; DORSETT, 1986), onde muitos dos neurônios envolvidos podem ter conexões com diferentes órgãos-alvos, constituindo neurônios multimodais por participarem de mais de um processo fisiológico (ALEVIZOS *et al.*, 1989). Em Opisthobranchia os efetores visceromotorios são controlados pelo gânglio abdominal e pelo complexo pedal-pleural (DIERINGER *et al.* 1978; KOCH *et al.* 1984; XIN *et al.* 1996). Em *Aplysia*, o controle do intestino médio apresenta inervação por neurônios oriundos dos gânglios pedais, pleurais e do abdominal, além do exercido pelos gânglios cerebrais (XIN *et al.*, 2001). A identificação de alguns neurônios subesofageais que se projetam do gânglio visceral e gânglio parietal direito para várias vísceras são conhecidos em *H. pomatia* e *H. aspersa* (PARMENTIER, 1973; KERKUT *et al.*, 1975; RÓZSA, 1987; JANAHMADI *et al.*, 1999), em *L. stagnalis* (WINLOW & BENJAMIN, 1976; HAYDON and WINLOW, 1981; SLADE *et al.*, 1981) e em *A. fulica* (SANTOS *et al.*, 1992). Dentre estes se destacam o V21 e RPA1 dos gânglios visceral e parietal direito de *H. pomatia* (ELEKES *et al.*, 1985) e E13, E10 (viscerais) e F1 e F76 (parietal direito) de *H. aspersa* (KERKUT *et al.*, 1975; JANAHMADI *et al.*, 1999). Contudo, não são encontrados na literatura dados referentes aos neurônios centrais que inervam diretamente as porções média e posterior do tGI em gastrópodes.

INERVAÇÃO PERIFÉRICA

Na análise do SN de moluscos, há de ser considerado com grande ênfase o sistema nervoso periférico, por ser muito desenvolvido, sendo o número de neurônios maior do que o encontrado no SNC (PROSER, 1991; CROLL *et al.*, 1999), em função do esqueleto hidrostático dos moluscos.

O gânglio cerebral inerva a porção anterior do SD, juntamente com os gânglios bucais. Um número variável de nervos labiais para o lábio e extremidade anterior e da parede dorsal da cabeça, enquanto que o gânglio bucal e comissuras inervam a rádula, parede da faringe e esôfago, glândulas bucais e, quando presentes, as glândulas de veneno dos prosobrânquios. Os nervos labiais em pulmonados são três pares: superior, médio e

inferior, que se unem constituindo um plexo. Um par de nervos esofageais parte dos gânglios bucais e inervam a porção anterior do esôfago, enquanto que um par ganglionar e outro par de nervos comissurais inervam os músculos da massa bucal. Estes nervos em opistobrânquios participam da formação de um plexo nervoso localizado na parede do tGI. Em Prosobranchia e Opistobranchia, o nervo visceral surge dos gânglios intestinais conectando-os ao gânglio visceral, que emite nervos para a porção pós-esofágica do tGI e um nervo para o reto, ainda podem estar presentes dois gânglios viscerais acessórios (HYMAN, 1967).

Com relação à inervação do intestino médio e posterior, a literatura reporta diferentes situações para a origem e distribuição dos nervos. Grande parte dos autores reporta que a inervação do intestino médio provém do gânglio bucal (HYMAN, 1967, SCHWARZ & SUSSWEIN, 1984, 1986) ou do pleural (HYMAN, 1967), todavia a descrição de que o gânglio visceral é o principal responsável por esta tarefa é relatado em *Strophocheilus lorentzianus* (SCOTT, 1939), *Helix pomatia* e *H. aspersa* (ELEKES *et al.*, 1985; SCHMALZ, 1914; BAGUST *et al.*, 1979; ANTKOWIAK & CHASE, 2003, respectivamente). Bullock & Horridge (1965) descrevem em helicídeos a existência de um nervo intestinal, um cutâneo palial e um anal surgindo do gânglio visceral (**Fig. 1B**). Assim como o descrito em *Achatina fulica*, o gânglio visceral emite quatro nervos incluindo um proeminente nervo intestinal (ABEYESEKERA & BRECKENRIDGE, 1979), enquanto que Kruatrachue *et al* (1993) afirmam que o gânglio visceral, nesta mesma espécie, emite três nervos, dentre eles o visceral e o anal. No entanto em *Achatina fulica*, o nervo visceral é descrito como emitindo quatro ramos, sendo estes: ramo reno-pericardial, que também se dirige a gônada; ramo uterino; ramo para o saco espermatogênico e glândula digestiva; e o ramo intestinal que supre com vários ramos o estômago e o intestino (GHOSE, 1962). Já em *Archachatina marginata* dois nervos são emitidos a partir do gânglio visceral, o nervo visceral, que emite ramos aórtico, cardíaco, renal e genital, além do ramo intestinal, e o nervo retal, que surge à direita do nervo visceral e inerva o reto e ânus (NISBET, 1961). Roach (1968) descreveu que em *Arion ater*, o gânglio visceral emite três nervos, destacando que o nervo intestinal anastomosa-se a um plexo nervoso sobre a parede do estômago, enquanto que o nervo anal inerva o reto e ânus.

Sobre o nervo intestinal (SCHMALZ, 1914; ABEYESEKERA & BRECKENRIDGE, 1979; BAGUST *et al.*, 1979; ELEKES *et al.*, 1985; ANTKOWIAK & CHASE, 2003), parece mais coerente o termo visceral comum ou próprio (SCOTT, 1939; GHOSE, 1962; HYMAN, 1967) devido ao grande número de vísceras inervado por ele. Em *Helix aspersa* o nervo origina apenas três troncos principais: cardíaco, responsável pela inervação do intestino, ventrículo, átrio e rim; ramo delgado para as estruturas do lado direito do corpo e ramo do ducto hermafrodita e topo da massa visceral (BAGUST *et al.*, 1979). Em *Helix pomatia* (ELEKES *et al.*, 1985) foi observado que o nervo intestinal ao sair de um tronco junto ao gânglio visceral emite um ramo para a glândula salivar, continuando como um tronco que sofre duas grandes bifurcações. A primeira emitindo ramos individuais para intestino, coração e parte do glândula digestiva, enquanto que a segunda dirige-se somente ao intestino, onde divide-se novamente em dois grandes ramos. Destes ramos o primeiro inerva o ovotestis e o ducto hermafrodita e o segundo ramifica-se para a glândula de albúmen, o fígado, o intestino, o rim e a parede corpórea. Sempre constante em todas as descrições foi à existência de um nervo anal emitindo ramos para o reto (SCOTT, 1939; BULLOCK & HORRIDGE, 1965; HYMAN, 1967; ABEYESEKERA & BRECKENRIDGE, 1979).

Um rico plexo cobre a parede do intestino ao longo do seu comprimento, organizado em uma rede mais densa em alguns pontos do que em outros, constituindo o SNEG (BISOGLNI, 1896; STEFANELLI, 1932, 1934; ÁBRAHÁM, 1940). As células nervosas encontram-se dispersas individualmente ou em grupos, tanto nos cruzamentos de fibras nervosas como entre elas (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). Contudo, durante certo período o termo SNEG foi aplicado aos gânglios bucais, por se acreditar que esta estrutura pertencia a este gânglio (LACAZE-DUTHIERS, 1898; RUSSEL, 1929). Russel (1929) observou que em *Elysia viridis*, *Aeolida papillosa* e *Fiona marina* os nervos gastro-esofágicos unem-se aos nervos gastro-hepáticos, originados do gânglio abdominal, formando um plexo gastro-esofágico na parede ventral do estômago. Em *Arion ater*, do gânglio bucal surgem os nervos gástrico esquerdo e direito, que acompanham as glândulas salivares e o papo, passando e se espiralando ao longo deste órgão e constituindo um conjunto de gânglios e fibras nervosas sobre a parede do estômago (ROACH, 1968). Nesta espécie, o nervo intestinal se anastomosa com os nervos gástricos neste plexo, onde podem ser observados três níveis de inervação: superficial, intramuscular e subepitelial, onde um grande gânglio se localiza na curvatura menor do

estômago (ROACH, 1968). A formação de uma rede sobre a parede da moela foi observada em *Aplysia oculifera* e *A. fasciata*, nestas espécies a rede se origina do ramo posterior do nervo esofageal e se encontra sobre a parede do esôfago (SCHWARZ & SUSSWEIN, 1984, 1986). Ainda em *Aplysia*, o SNEG (Fig. 2) é formado por um anel nervoso ao redor da junção entre o papo e a moela, constitui-se por células nervosas dispostas lado-a-lado e ocasionalmente formando grupos (FUJISAWA *et al.*, 1999; FURUKAWA *et al.*, 2001; MORISHITA *et al.*, 2003; ITO & KUROKAWA, 2002; 2007).

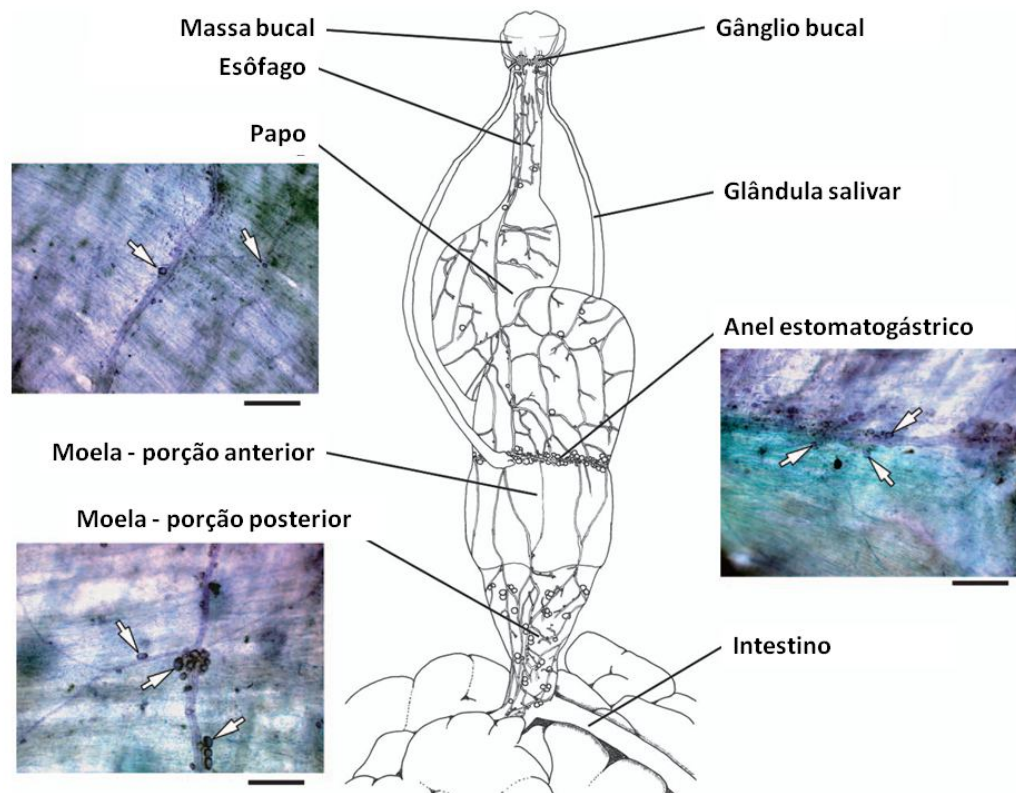


Figura 2. Esquemática do sistema nervoso do trato digestivo em *Aplysia*, indicando a distribuição de elementos nervosos na superfície externa do esôfago, papo e moela, que se divide em porção anterior e posterior, em vista ventral. O anel estomatogástrico está localizado na transição do papo com a moela, que emite fibras que se conectam a outros grupos de neurônios situados na superfície da parede do esôfago, papo e porções anterior e posterior da moela. Do gânglio bucal são emitidos os nervos esofageais que se anastomosam com a rede estomatogástrica. As fotomicrografias indicam os nervos e somas localizados nos órgãos digestivos e no anel estomatogástrico, corados com azul de metileno. Barra: 500 μm (ITO & KUROKAWA, 2007).

INERVAÇÃO INTRÍNSECA DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES

A existência de uma rede neural entérica controlando a funcionalidade do tGI é descrita em vários grupos de invertebrados (COPENHAVER; TAGHERT, 1991; HARTENSTEIN, 1997; GARCÍA-ARRARÁS *et al.*, 2001; BARNA *et al.*, 2001; SHIMIZU *et al.*, 2004; AYALI, 2004). A presença de plexos é descrita em várias espécies de gastrópodes (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). Os primeiros dados sobre este sistema foram obtidos em estudos com *Limax* (BISOJNI, 1896; STEFANELLI, 1932ab; 1934ab) e *Helix pomatia* (PARAVICINI, 1898; ÁBRAHÁM, 1940), que continua sendo a espécie mais estudada. As redes neurais, muito semelhantes às observadas em mamíferos, organizam-se paralelamente entre as túnicas da parede dos órgãos digestórios e podem ser divididas em dois plexos: submucoso e mioentérico (ÁBRAHÁM, 1983).

Apesar desta diversidade de repertórios comportamentais, a rede mantém o mesmo padrão: neurônios esparsos, dispostos isoladamente ou formando pequenos grupamentos associados à enterogliócitos (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). Estes neurônios apresentam pequeno diâmetro, representados na sua maioria por células unipolares, bipolares e multipolares (LLOYD *et al.*, 1988; ITO & KUROKAWA, 2004). No plexo submucoso (PS) são observados neurônios unipolares cujas projeções formam uma rede que inerva a mucosa e glândulas mucosas, além de conectar-se ao plexo mioentérico (PM, ALBA *et al.*, 1988). A rede mientérica contém muitos neurônios unipolares, alguns bipolares que podem estar isolados ou em grupos que inervam as camadas musculares circular e longitudinal do tGI (ROACH, 1968). Um grande aglomerado de neurônios está presente na transição entre a porção anterior e posterior do papo em *Amphibola crenata* (PILKINGTON, 1981, 1982) e entre o estômago e o intestino em *Arion ater* (ROACH, 1968).

Além da população neuronal, o SNE apresenta um número considerável de receptores intra-epiteliais (*neuron-like intraepithelial cells*), que morfológicamente apresentam dois tipos distintos: aberto e fechado (ZAITSEVA, 2006). Estas células intra-epiteliais são distribuídas irregularmente ao longo do trato, sendo abundantes em algumas regiões enquanto outras quase não as possuem, sendo mais frequentes no tGI de opistobrânquios e pulmonados. O tipo aberto caracteriza-se por expor sua região apical na luz do tGI, onde um longo microvilo ou cílio se projeta. No entanto, processos basais ramificados não são característicos de todas as células do tipo aberto. Alguns deles têm vários processos de espessura curta que terminam no limite do epitélio basal, perto da

própria célula formando um plexo subepitelial. As extremidades destes processos são geralmente alargadas e planas, especialmente nas proximidades da membrana basal. É possível que as células do tipo aberto com processo curto desempenhem um papel de elementos do sistema endócrino, além de sua função sensorial dentro do tGI. Muitas células do tipo aberto, com longos processos basais e os cílios na superfície apical são observados nas regiões do estômago (ZAITSEVA, 2006, ZAITSEVA *et al.*, 2009). As células do tipo fechado, também foram revelados no epitélio do tGI, caracterizam-se por não serem expostas à luz do trato e localizarem-se principalmente na metade basal da camada epitelial. Estas células são cilíndricas ou arredondas ao longo do epitélio, com vários processos basais que diferem em comprimento e devido à forma e distribuições dos seus processos, as células do tipo fechado, podem servir como fibras de associação nos plexos nervosos intra e subepiteliais, bem como entre os seios hemal e células musculares localizados junto a estes plexos (ZAITSEVA, 2006, ZAITSEVA *et al.*, 2009).

Muitos estudos em invertebrados descrevem três tipos de células gliais periféricas: perineural dos tipos I e II e subneural, correspondente à célula de Schwann, associadas aos nervos (VERNADAKIS & ROOTS, 1995). No entanto, em relação aos enterogliócitos não foram encontrados dados relativos a invertebrados.

CÓDIGO QUÍMICO DO CONTROLE NERVOSO DO SISTEMA DIGESTÓRIO EM GASTRÓPODES

Muitos neurotransmissores participam do controle do comportamento alimentar. A maioria dos motoneurônios bucais é colinérgica (COHEN *et al.*, 1978) e um pequeno número é glutamatérgico (FOX & LLOYD, 1999), podendo inervar o mesmo músculo (KEATING & LLOYD, 1999). Em neurônios GCP, a acetilcolina (ACh) é liberada por interneurônios da fase de protração, enquanto que o glutamato é liberado por interneurônios da retração (QUINLAN & MURPHY, 1991; ELLIOTT & KEMENES, 1992; YEOMAN *et al.*, 1993; VEHOVSZKY & ELLIOTT, 1995; QUINLAN *et al.*, 1995; BRIERLEY *et al.*, 1997c). Por exemplo, em *Aplysia*, *Limax* e *Pleurobranchaea* alguns dos NCC, interneurônios, quimio e mecanorreceptores labiais são colinérgicos (MORIELLI *et al.*, 1986; KING *et al.*, 1987; HURWITZ *et al.*, 1999a; SUSSWEIN *et al.*, 1996).

A 5-HT está presente na célula gigante cerebral em todas as espécies, atuando na modulação de neurônios sensoriais, interneurônios e motoneurônios, bem como na

musculatura bucal (*Lymnaea*: McCROHAN & BENJAMIN, 1980ab; YEOMAN *et al.*, 1994ab, 1996; *Aplysia*: KUPFERMANN, 1997; *Achatina*: YOSHIDA & KOBAYASHI, 1991; *Helix*: BERNOCCHI *et al.*, 1998; *Pleurobranchaea*: GILLETTE & DAVIS, 1977; MOROZ *et al.*, 1997; SUDLOW *et al.*, 1998). Dopamina e octopamina estão presentes nas células do gânglio bucal e também modulam o padrão cíclico (ELEKES *et al.*, 1991; HERNÁDI *et al.*, 1993; KABOTYANSKI *et al.*, 1998; QUINLAN *et al.*, 1997; TEYKE *et al.*, 1993). Além disso, muitos neurônios periféricos no intestino de *Helix* e *Aplysia* podem ser dopaminérgicos (HERNÁDI *et al.*, 1998; SUSSWEIN *et al.*, 1993). Em *Lymnaea*, antagonistas da octopamina (mas não antagonistas da dopamina) geram comportamento alimentar fictício, efeito explicado pela presença de três neurônios octopaminérgicos no gânglio bucal (VEHOVSZKY *et al.*, 1998). Neurônios semelhantes estão presentes em *Helix* (HIRIPI *et al.*, 1998) e *Helisoma* (QUINLAN & MURPHY, 1996).

Os transmissores peptídicos identificados no sistema alimentar incluem o *Small cardioactive peptide* (SCP), FMRFamida, APGWamida, bucalina e miomodulina (pQIPMLRLamida), estando presentes em neurônios sensoriais, motores e interneurônios. ICB-12 em *Aplysia* contém miomodulina (HURWITZ *et al.*, 1999ab) e os interneurônios bucais SO e N1L em *Lymnaea* (YEOMAN *et al.*, 1993; SANTAMA *et al.*, 1994; VEHOVSZKY & ELLIOTT, 1995), enquanto que os mecanorreceptores da rádula utilizam SCP e glutamato (KLEIN *et al.*, 2000). O neuropeptídeo nativo de invertebrados fenilalanina-metionina-arginina-fenilalanina (FMRFamida) inibe a alimentação em *Helisoma* e *Lymnaea* (MURPHY *et al.*, 1985; KYRIAKIDES e McCROHAN, 1989), em resultado da ação de um neurônio do gânglio pleural que se projeta para o gânglio bucal (*Helisoma*: MURPHY, 1990; *Lymnaea*: ALANIA *et al.*, 2002). Esta ligação é conservada em muitas espécies, incluindo *Lymnaea* e *Helix*, e até mesmo no predador carnívoro *Clione* (ALANIA, 1995; ALANIA *et al.*, 1999).

Neurônios que contêm óxido nítrico sintase (NOS) são específicos do SNC de *Pleurobranchaea* (MOROZ e GILLETTE, 1996) e *Clione* (MOROZ *et al.*, 2000), enquanto que nos gastrópodes herbívoros muitos neurônios periféricos contêm NOS e atuam na regulação da alimentação. O óxido nítrico (NO) desempenha um papel proeminente no sistema alimentar de gastrópodes. Sensores químicos labiais liberam NO, além de ACh, cujo aumento dos seus níveis no gânglio cerebral pode induzir ciclos repetitivos do programa alimentar (MOROZ *et al.*, 1993; ELPHICK *et al.*, 1995; MOROZ, 2000). O neurônio motor intestinal B2

em *Lymnaea* produz excitação de outros motoneurônios liberando ACh e NO (PARK *et al.*, 1998; PERRY *et al.*, 1998). As células gigantes serotoninérgicas nos gânglios cerebrais também expressam o gene da enzima NOS (KORNEEV *et al.*, 1998, 1999), além de serem moduladas pela liberação de histamina e NO por um neurônio aferente primário bucal (KOH & JACKLET, 1999). No lobo procerebral são observados interneurônios que respondem aos odores dos alimentos com oscilações provocadas pelo NO e CO (GELPERIN *et al.*, 2000). Tem sido sugerido que as diferenças na distribuição da NOS podem estar relacionadas à ecologia alimentar, pois os carnívoros comem grandes refeições, enquanto que os herbívoros pastam durante muitas horas por dia (MOROZ *et al.*, 2000). Outros transmissores, incluindo o ácido γ -aminobutírico (GABA), que é encontrado nos neurônios do gânglio bucal e cerebral em *Lymnaea* (HATAKEYAMA e ITO, 2000), *Helix* (HERNÁDI, 1994), *Helisoma* (RICHMOND *et al.*, 1991, 1994) e *Aplysia* (DIAZ-RIOS *et al.*, 1999), também desempenham um papel na ativação do padrão alimentar, provavelmente através de ações do interneurônios GABAérgicos cérebro-bucalis e buco-cerebral. A injeção de GABA na hemocele de *Clione* evoca também os movimentos alimentares (ARSHAVSKY *et al.*, 1993).

O código químico do SNE em gastrópodes mostra-se extremamente variada (HERNÁDI *et al.*, 1998; OKAMOTO *et al.*, 2007). Um estudo comparativo sobre o plexo entérico de um caracol (*Helix pomatia*), de dois insetos e de um peixe revelou a presença de catecolaminas na camada muscular do trato alimentar destes quatro modelos experimentais utilizados, de onde se propõe, portanto, a existência universal de controle aminérgico sobre a motilidade intestinal (HALASY *et al.*, 1988).

A ACh tem funções excitatórias no SNE, sendo amplamente distribuída em ambos plexos (PERRY *et al.*, 1998), enquanto que a 5HT e o FMRF-amida apresentam atividade inibitória (GIARDINO *et al.* 1996; HERNÁDI *et al.*, 1998). A distribuição destes transmissores inclui somas neuronais, contudo prevalece uma ampla rede constituída de fibras e varicosidades. Por exemplo, em *Helix* foi observada uma rica inervação de elementos 5HT e FMRF-aminérgicas, contudo a inervação dopaminérgica mostrou-se pouco presente. Somas FMRF-aminérgicos foram encontrados na mucosa e no plexo submucoso, já os somas 5HT-érgicos restringiram-se a poucos neurônios bipolares e algumas células intra-epiteliais, enquanto que os dopaminérgicos localizavam-se somente na submucosa (HERNÁDI *et al.*, 1998). No tGI de *Helix*, uma reação de diaforase delinhou a presença de corpos de células

dispostas em pequenos gânglios, interligados por feixes de fibras (HALASY *et al.*, 1988), no entanto as estruturas FMRFaminérgicas e os corpos celulares dopaminérgicos não mostraram organização ganglionar em qualquer parte do trato digestivo (HERNÁDI *et al.*, 1998). Ainda, estudos bioquímicos indicam que este neuropeptídeo está envolvido na biosíntese do NO (RÖSZER *et al.*, 2006).

Fibras e varicosidades imunorreativas a alguns peptídeos, como o SCP e miomodulina foram encontrados na porção média e anterior do tGI, respectivamente (LLOYD *et al.*, 1988; PERRY *et al.*, 1998). Mais recentemente, foi descrito um peptídeo de ação inibitória sobre a musculatura do trato intestinal em *Aplysia*, o qual foi denominado de enterina (FURUKAWA *et al.*, 2001). Somas neuronais e processos enterina-positivos foram encontrados no intestino, onde sua atividade inibiu as contrações intestinais. Porém, densos processos enterina-positivos foram observados no anel estomatogástrico, não sendo detectados somas (FUJISAWA *et al.*, 1999, 2001). A presença de células e fibras imunorreativas a α e β -endorfina, α e β -MSH, met-enkefalina, somatostatina, insulina, glucagon e polipeptídeo pancreático (PP) foram detectadas em diferentes porções do tGI de *Helix aspersa* (MARCHAND & COLARD, 1991), assim como na inervação intestinal de *Achatina fulica* foram identificadas: secretina, substância P, encefalinas e PP (VAN NOORDEN *et al.*, 1980). Enquanto que em *Helix pomatia* demonstrou uma desenvolvida inervação leucocinina-positiva no intestino, formada por grossos feixes de axônios (ELEKES *et al.*, 1994).

Outra característica química descrita para o sistema nervoso entérico dos vertebrados em geral é a presença de neurônios contendo a NOS (WARD *et al.*, 1992; BALASKAS *et al.*, 1995; OLSSON & GIBBINS, 1999). O NO atua como um relaxante da musculatura lisa, diminuindo os movimentos peristálticos (KARILA & HOLMGREN, 1995), constituindo uma molécula sinalizadora evolutivamente conservada, presente no sistema nervoso dos invertebrados (SADAMOTO *et al.*, 1998; ELPHICK & MELARANGE, 2001), sendo amplamente investigada a sua formação e participação no controle da rede nervosa entérica (RÖSZER *et al.*, 2005; SERFÖZÖ *et al.*, 2008). Em alguns moluscos estilomatóforos investigados foi detectada a NADPH-diaforase em redes de neurônios submucosos e mioentéricos e em nervos extrínsecos nos segmentos do intestino médio de membros das famílias Helicacea, Succineacea e Vertiginacea. Estas redes estrínsecas inervam a musculatura do intestino e as células nervosas submucosas ou mientéricas (RÖSZER *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA & OBJETIVO

Megalobulimus abbreviatus (MNRJ 13283), previamente citado incorretamente em trabalhos anteriores como *Megalobulimus oblongus* ou *Strophocheilus oblongus*, é um molusco gastrópode pertencente à ordem Stylommatophora da subclasse Pulmonata. Os estilomatóforos caracterizam-se por serem terrestres, possuindo dois pares de tentáculos cefálicos com os olhos localizados na extremidade distal do par posterior. Esta espécie distribui-se no sul do Brasil, Argentina e Paraguai, vive geralmente em ambientes úmidos podendo ficar enterrados se a umidade relativa do ar for muito baixa (SAWAYA & PETERSEN, 1962; DE JORGE *et al.*, 1965). Embora ainda não existam estudos precisos sobre o ciclo de vida desta espécie, dados de observações em campo indicam que a idade reprodutiva adulta inicia entre dois anos e meio (DEISLER & STANGE, 1982) e cinco anos (JAEGER, 1965), e que o tamanho corporal adulto máximo (7-8 cm de comprimento da concha) pode ser caracterizado pelo peristômio (bordo) refletido da concha (THOMÉ, 1994). *M. abbreviatus* é um caracol "iteroparous", apresentando ciclo reprodutivo anual caracterizado por acasalamento e oviposição durante a primavera e o início do verão e pela preparação do sistema reprodutor para uma nova fase reprodutiva, que se inicia em janeiro e se estende até o final do inverno. A ovogênese e espermatogênese são contínuas ao longo do ano, com os espermatozoides produzidos durante quase todo ano, com possível interrupção no inverno, enquanto grandes quantidades de oócitos maduros ocorrem apenas na primavera (HORN *et al.*, 2005). Dados sobre a variação sazonal do metabolismo intermediário desta espécie estão de acordo com o ciclo reprodutivo anual (DA SILVA & ZANCAN, 1994).

M. abbreviatus constitui um modelo biológico amplamente utilizado em diferentes abordagens experimentais. O SNC de *M. abbreviatus* tem sido caracterizado através de estudos morfológicos (DONELLI *et al.*, 1998; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999, 2004; NÓBLEGA *et al.*, 2003, 2006) neuroquímicos e fisiológicos (ZANCAN *et al.*, 1994 e 1997; SANTOS *et al.*, 2002; DE FRAGA *et al.*, 2004, 2010; ACHAVAL *et al.*, 2005; DOS SANTOS *et al.*, 2005; SWAROWSKY *et al.*, 2005; GASPARG *et al.*, 2007, RIGON *et al.*, 2009, 2010). Considerando os circuitos neuro-viscerais, os enfoques foram: o circuito respiratório (OLIVEIRA, 2006), a regulação central e periférica da atividade cardíaca (ANTUNES, 2009) e o controle reprodutivo (ZANCAN & ACHAVAL, 1995; HORN *et al.*, 2005; MORAES *et al.*, 2010).

O SNC de *M. abbreviatus* é formado por onze gânglios, nove dos quais constituem o anel ganglionar principal (gânglios cerebrais, pedais, pleurais, parietais e visceral) que circunda o esôfago (**Fig. 3**). À exceção do gânglio visceral, os demais gânglios são pareados. Os dois gânglios bucais, localizados distalmente aos demais, conectam-se ao anel periesofageano através dos conetivos cérebro-bucais. Ao redor da artéria cefálica, estão organizados os gânglios que constituem o complexo ganglionar subesofageal. Esses gânglios são unidos entre si por conetivos neurais extremamente curtos e aos gânglios cerebrais, dorsais ao esôfago, pelos conetivos cérebro-pedal e cérebro-pleural. Conectando o par de gânglios pedais estão duas comissuras igualmente curtas: uma de maior diâmetro, central, e uma menor, ântero-ventral (ZANCAN *et al.*, 1994; ZANCAN *et al.*, 1997).

Tanto o SNC como algumas regiões do sistema nervoso periférico de *M. abbreviatus* possuem neurônios serotoninérgicos (ZANCAN *et al.*, 1997; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004; SWAROWSKI *et al.*, 2005), catecolaminérgicos (ZANCAN *et al.*, 1997), colinérgicos (ZANCAN *et al.*, 1994), nitrérgicos (RIGON *et al.*, 2009 e 2010) e peptidérgicos imunorreativos a peptídeos relacionados à substância P (RIGON *et al.*, 1998) e à FMRF-amida (MORIGUCHI-JECKEL, 2001).

Considerando que *M. abbreviatus* representa um modelo experimental ainda utilizado no sul do país em estudos neurobiológicos e a inexistência de informações sobre o controle nervoso central do intestino médio e posterior e, considerando, ainda, as divergentes descrições nos moluscos gastrópodes sobre a morfologia e o código químico envolvidos neste processo, tornou-se relevante a execução do presente estudo. Neste sentido, a presente pesquisa teve como **objetivo geral** identificar e descrever as vias nervosas centrais que controlam a atividade digestória da região do intestino médio (estômago e intestino) e posterior (reto). Foi analisada a estrutura da parede destes órgãos, buscando determinar a existência de neurônios periféricos que possam estar constituindo plexos viscerais, associado à análise da natureza química de alguns possíveis mediadores envolvidos nestes plexos no caracol pulmonado *M. abbreviatus*.

Buscando facilitar a leitura deste manuscrito, foi optada pela apresentação de cada **objetivo específico** conjuntamente com a descrição das abordagens experimentais realizadas para que estes fossem atingidos. A descrição completa dos resultados obtidos encontra-se no corpo de cada artigo.

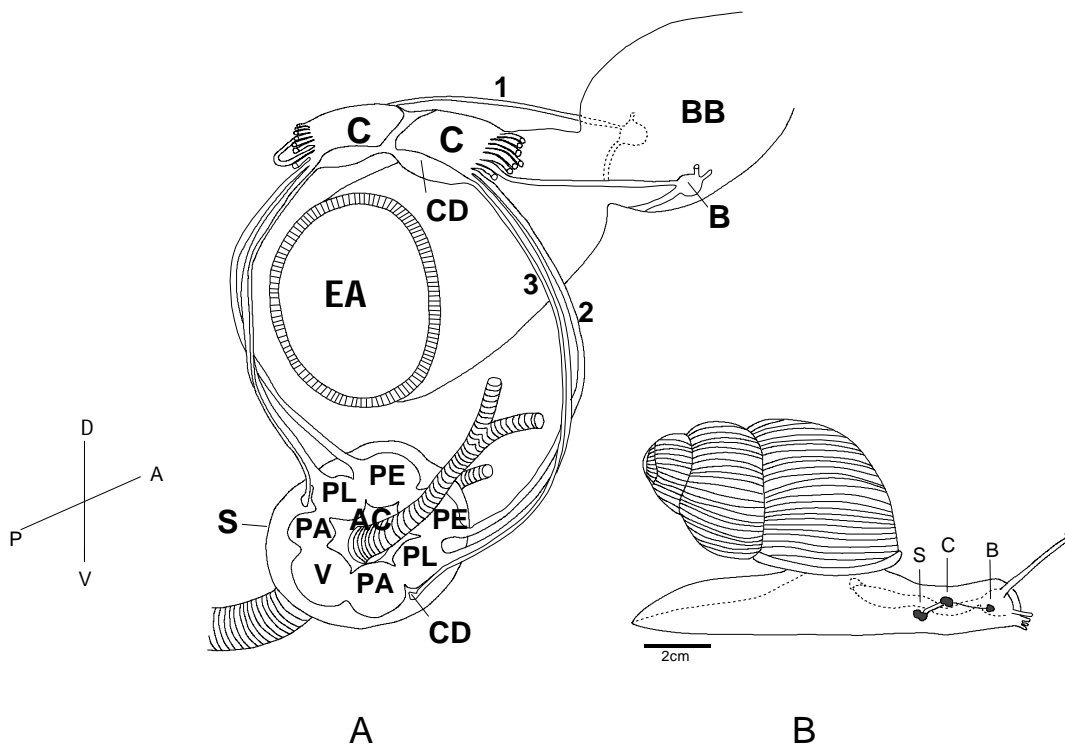


Figura 3. Organização do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus abbreviatus*: **A.** Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. **AC**, artéria cefálica; **BB**; bulbo bucal; **CD**, corpo dorsal; **EA**, esôfago anterior; **PA**, gânglios parietais; **PE**,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

3. METODOLOGIA & RESULTADOS

COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados caracóis adultos *M. abbreviatus* BECQUAERT 1948, coletados nos municípios de Charqueadas (29°57'17''S - 51°37'31''W) e Minas do Leão (30°07'36''S - 52°02'51''W), Rio Grande do Sul (Fig. 4). Os caracóis pesaram $57,48 \pm 0,85$ g e suas conchas mediram $71,62 \pm 0,32$ mm de comprimento e $38,20 \pm 0,12$ mm de largura (média \pm erro padrão). Os animais foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Neurobiologia Comparada (Departamento de Fisiologia, UFRGS), alimentados diariamente com alface e água *ad libitum* sob condições controladas de temperatura (22 - 26°C) e fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro; fotofase: 7 h – 19 h). A terra dos terrários foi revolvida frequentemente e regada diariamente com água para que a umidade para os animais fosse mantida elevada. Um umidificador foi colocado na sala onde os animais foram mantidos, visando à manutenção da umidade. Após a coleta no campo, os animais sofreram um período de aclimação de no mínimo 20 dias sob as condições acima citadas antes de serem utilizados para os experimentos. Antes de cada experimento, os animais foram lavados, pesados, medidos e anestesiados por imersão em solução saturada de mentol dissolvida em solução fisiológica para a espécie *M. abbreviatus* (29,5 mM NaCl, 2,4 mM KCl, 6 mM CaCl₂) por 30 a 40 minutos (JAEGER, 1961, ZANCAN *et al.*, 1994; 1997). Todos os animais foram tratados conforme as normativas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

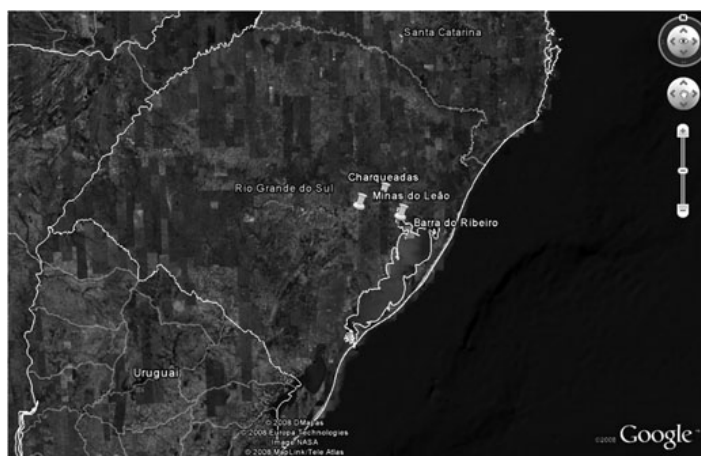


Figura 4. Identificação geográfica dos municípios de Charqueadas (29°57'17''S - 51°37'31''W) e Minas do Leão (30°07'36''S - 52°02'51''W), Rio Grande do Sul, onde localiza-se o caracol *M. abbreviatus*. Fonte: Google Earth.

ARTIGO I: GENERAL MORPHOLOGY AND INNERVATION OF THE MIDGUT AND HINDGUT OF *Megalobulimus abbreviatus* (GASTROPODA, PULMONATA)**OBJETIVO ESPECÍFICO**

Nesta etapa buscou-se elucidar a origem dos neurônios centrais envolvidos na inervação do intestino médio e posterior do tGI de *M. abbreviatus*, buscando determinar quais neurônios centrais e que nervos são responsáveis pelo controle destes segmentos (inervação extrínseca). Descreveu-se, ainda, a constituição da parede das vísceras que compõem estes segmentos, bem como a caracterização da porção periférica do sistema nervoso responsável pelo controle intrínseco do intestino médio e posterior.

METODOLOGIA

ESTUDO MORFOLÓGICO: Esta etapa constitui-se de diferentes procedimentos que permitiram: (1) descrever macroscopicamente os nervos responsáveis pela inervação dos intestinos médio e posterior; (2) identificar a constituição da parede do tGI por meio de técnicas histológicas e histoquímicas; (3) descrever a morfologia das redes nervosas intramurais por meio de impregnação argentáfinica e coloração de azul de metileno. A terminologia anatômica utilizada foi baseada nos trabalhos de Hyman (1967), Grassé (1968), Carriker (1946) e Tillier (1989).

Para os procedimentos de **descrição anatômica**, 20 animais foram anestesiados e após a retirada da concha, o animal foi dissecado por meio de uma incisão dorsal, sendo rebatidos o manto, o pulmão, o rim, o coração e o diafragma, preservando toda a massa visceral restante, principalmente as porções do intestino médio (estômago, intestino e glândula digestiva), bem como o reto e ânus. Foram realizadas dissecações em diferentes níveis, sempre mantendo-se intacto o complexo ganglionar subesofageal e os nervos do gânglio visceral. Com auxílio de um microscópio cirúrgico (DF Vasconcellos) os nervos foram identificados e separados do tecido conjuntivo e vasos. As preparações foram fixadas em formaldeído 10% e posteriormente fotografadas para fotodocumentação (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

Na **descrição histológica** da parede do tGI foram utilizados 12 caracóis que tiveram sua concha retirada, sendo o manto e o diafragma rebatidos. Isolou-se o estômago, intestino e reto que foram retirados e lavados em solução fisiológica para esta espécie (JAEGER,

1961). O material foi fixado em solução de Bouin, sendo posteriormente desidratado em soluções de álcoois de concentrações crescentes e clorofórmio. Seguiu-se a impregnação em três banhos de parafina, sendo realizados cortes transversais e horizontais (10 µm de espessura) em micrótomo (Leica RM 2125). Os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secados e desparafinados para posterior coloração. Para cada série de 10 cortes sequenciais foram realizadas as colorações de hematoxilina-eosina e hematoxilina-férrica de Heidenhain, para a identificação da estrutura da parede, e ácido periódico de Schiff (PEARSE, 1972), buscando a presença de células contendo carboidratos na mucosa. Logo após, as lâminas foram desidratadas, diafanizadas e cobertas com bálsamo do Canadá e lamínulas. Outros 4 animais foram dissecados e coletados o intestino médio e posterior, que após fixação em solução de formol-cálcio de Baker, foram lavados e crioprotetidos em solução de sacarose 15% e 30%, diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e congelados em meio especial (Tissue-tek, Leika). O material foi seccionado em criostato (Micron HM 505E, 10 µm) e os cortes seriados foram aderidos em lâminas gelatinizadas. Os cortes foram, então, submetidos à técnica histoquímica de Sudan Black (PEARSE, 1972) visando detectar células com depósito de lipídios na mucosa do tGI. Os resultados obtidos foram observados em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

A técnica de **Impregnação Argentafínica de Bielschowsky-Gros** (modificada por GARVEN & GAIRNS, 1952) foi empregada para identificação dos plexos nervosos entéricos em cortes da parede do estômago e preparados de membrana do intestino e reto de 12 caracóis. Após a retirada os órgãos foram fixados em uma solução de formaldeído 12% por 15 dias, a partir de solução estoque de formaldeído 20% tamponado com carbonato de magnésio. Após este período o material foi lavado em água destilada acrescida de 0,0005% de NaCl (Solução 1). Logo após, o estômago foi congelado em meio especial (Tissue-tek, Leika) e seccionado longitudinal e horizontalmente em criostato a 50 µm (Micron HM 505E). Os cortes foram individualmente lavados várias vezes em grandes volumes de água destilada, utilizando-se um bastão de vidro. Na etapa seguinte, cada corte foi imerso em 15 ml de solução de nitrato de prata 25% (Merck) em água destilada por 10 min a 2 h, protegido da luz e o bastão de vidro foi lavado a cada corte. A seguir, os cortes foram lavados em uma mistura da solução 1 acrescida de 20% de formaldeído tamponado. Após a lavagem, cada corte foi levado do banho de prata na ponta de um bastão de vidro ao primeiro banho,

sendo rapidamente removido. A etapa de impregnação consistiu na preparação de uma solução de prata amoniacal (nitrato de prata 25% acrescida de amônia 25%, Merck). A reação foi observada em microscópio (Nikon Optiphot-2) e bloqueada com a remoção do tecido e a rápida transferência para o banho de amônia. Após a impregnação, os cortes foram submetidos a um banho de amônia e novamente lavados em água destilada repetidas vezes. Concluída a impregnação, procedeu-se a tonalização com uma solução de tiocinato de amônia 3% e tiosulfato de sódio 3%, na qual era acrescido cloreto de ouro 1% e uma última lavagem com ácido acético 0,1% em água destilada.

O intestino e o reto, depois de fixados, foram abertos seguindo o eixo longitudinal, sendo confeccionados preparados de membrana das túnicas submucosa e muscular. Os preparados consistiam na retirada cuidadosa da túnica mucosa, seguida da submucosa e serosa, enquanto que a túnica muscular foi mantida intacta. A túnica submucosa e a muscular foram distendidas sobre lâminas. Logo após as lâminas contendo cortes ou os preparados de membrana foram desidratadas, diafanizadas e cobertas com bálsamo do Canadá e lamínulas. Os resultados obtidos foram observados em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

HODOLOGIA: Somas neuronais e suas projeções foram identificadas através dos métodos de traçamento de vias neurais com cloreto de cobalto (CoCl_2) acrescido de albumina 1%, biocitina, *Horseshoe peroxidase* e *Lucifer Yellow*. Foram realizadas marcações no sentido anterógrado, do sistema nervoso em direção as terminações periféricas no estômago, a partir do coto proximal do ramo gastrointestinal (rG), e no sentido retrógrado, do coto distal do rG e do nervo reto-anal (nR). Todas as preparações foram montadas em uma placa, dividida em dois compartimentos. No primeiro foi colocado o sistema nervoso (para marcação retrógrada) ou o estômago (para marcação anterógrada) submerso em solução fisiológica para espécie. No segundo, o coto distal do rG ou o nR ou o estômago imerso no traçador neural. A separação entre os compartimentos foi reforçada com barreira de vaselina sólida, para evitar a migração do marcador externamente ao nervo. Para controle desta possibilidade, gânglio de outro animal foi colocado junto na solução fisiológica do primeiro compartimento. Caso fosse constatado eventual vazamento do traçador, pela marcação no gânglio controle, a amostra era descartada. Os resultados

obtidos foram observados em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

O **traçamento neural com cloreto de cobalto (CoCl₂)** consiste no traçamento eficaz para a marcação de somas, axônios e dendritos ou ramificações axonais em invertebrados (DAVIES, 1982). Envolve o transporte dos íons cobalto no tecido nervoso, a precipitação do cobalto em sulfeto de cobalto e a intensificação do precipitado de cobalto com prata para torná-lo mais visível. Para facilitação do transporte intra-axonal do cobalto, o traçamento retrógrado com CoCl₂ (Sigma) 0,1M foi acrescido de albumina sérica bovina 0,1% (Sigma). Foram usados 14 animais para marcação do rG e 6 animais para marcação do nR. A preparação foi mantida em câmara úmida a 4°C por 5 (rG) ou 3 dias (nR). Após esse período de incubação, as preparações foram lavadas e reveladas com solução de sulfeto de amônio 0,3% (Merck), formando um precipitado de sulfeto de cobalto. Na sequência o material foi lavado e fixado por imersão em solução de Carnoy durante 1h e crioprotelado em solução de sacarose 30% diluído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (TF). Os tecidos embebidos em meio especial para congelamento (Tissue-tek, Leika) foram seccionados em criostato (Micron HM 505E, 50µm) e coletados em lâminas gelatinizadas. Os cortes passaram por intensificação do precipitado de sulfeto de cobalto com nitrato de prata (Merck) conforme o método de Davies (1982), seguido de diferenciação em solução de tiosulfato de sódio 2%. Após lavagem, seguiu-se a desidratação em série de álcoois de concentração crescente, diafanização em salicilato de metila e montagem das lâminas com bálsamo e lamínulas.

No **traçamento neural com Biocitina** foram utilizados 8 animais para a marcação retrógrada do RG e 6 animais para o nR. A biocitina (composto conjugado biotina-lisina; Sigma) foi diluída a 4%, em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. A preparação foi incubada por 72 h (rG) ou 48 h (nR) a 4°C. Após esse período, o material foi retirado da câmara e fixado em paraformaldeído 4% diluído em TF, durante 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente foram crioprotelados em solução de sacarose 15%, seguida de 30%, ambas diluídas em TF a 4°C, embebidos em meio especial para congelamento (Tissue-tek, Leika) e seccionados em criostato (Micron HM 505E, 50 µm). Os cortes (*free-floating*) foram incubados com o complexo de coloração ABC (complexo avidina-biotina-peroxidase, Vector), durante 2h. Depois de lavados em PBS, seguiu-se a revelação da reação em solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma), contendo 1ml de DAB 0,5% diluído em PBS, 0,25 ml de cloreto de cobalto, 8,4 ml de PBS e 0,25 ml de sulfeto de níquel amônio, ambos diluídos em água destilada a 1%,

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

Para o **traçamento neural com *Horseradish Peroxidase*** (HRP-Type VI, Sigma) foram utilizados 8 animais para a marcação retrógrada do RG e 4 animais para o nR. A HRP foi diluída a 4%, em KCl 0,1 M, onde o procedimento de marcação em placa seguiu o anteriormente descrito. A preparação de ambos os nervos foi incubada por 48 h a 4°C. Após esse período, o material foi retirado da câmara e fixado em paraformaldeído 1% e glutaraldeído 1% diluídos em TF, durante 1,5 h a temperatura ambiente. Posteriormente foram crioprotetidos em solução de sacarose 15%, seguida de 30%, diluídas em TF a 4°C e seccionados em criostato (Micron HM 505E, 50 μ m). Os cortes seriados aderidos em lâminas bi-gelatinizadas foram pré-tratadas com $CoCl_2$ 0.1% diluído tampão Tris-Maleato 0,1 M, pH 7,6 (TM) por 30 min, lavados em TM e revelados em DAB 0,05% diluído em TM durante 45 min, sendo acrescida de 0,2% de H_2O_2 por mais 10 min. Após a lavagem, seguiu-se a desidratação em série alcoólica, diafanização em xilol e montagem das lâminas com bálsamo e laminulas.

A **marcação anterógrada com *Lucifer Yellow*** (LY) foi realizada em preparações semi-intactas do rG (6 animais) ou a partir do estômago (4 animais). A preparação do rG consistiu na secção proximal do nervo e da porção distal mantida intacta na parede do estômago, enquanto a preparação no estômago consistiu na malha nervosa localizada dorsalmente fixada à parede do estômago. O coto proximal seccionado do rG foi exposto à água bidestilada por 5 min, para remover o potássio impedindo precipitação do LY e tornando o tecido mais excitável. Aplicou-se uma solução de LY a 20% diluído em água bidestilada. O experimento foi montado em placa com dois compartimentos, conforme descrito anteriormente, porém foi colocado um eletrodo de metal em cada compartimento, no da solução do LY com o coto do rG e no outro com o estômago. Posteriormente, foi transmitida uma corrente de 3 V, durante 30 min (OLAND, 1990). Após, retirou-se o sistema de corrente e seguiu-se incubação em uma câmara úmida por 72 horas a 4°C. Decorrido tempo de incubação, o estômago foi embebido em meio para congelamento (Tissue-tek, Leika), seccionado em criostato (Micron HM 505E, 50 μ m), os cortes foram coletados em lâmina bi-

gelatinizadas e montados com um meio contendo 80% de glicerol e 20% de carbonato de sódio 20 mM e lamínulas. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência (Olympus FV 1000), com filtro de excitação 380-425nm e de barreira 450nm.

Os neurônios marcados foram classificados de acordo com seu diâmetro em pequenos (10 - 40 μ m), médios (41 - 80 μ m), grandes (81 - 120 μ m) e gigantes (acima de 120 μ m). Os resultados serão expressos pelo número máximo de neurônios encontrados nos agrupamentos neuronais e na porcentagem que estes representam do total.

RESULTADOS

General morphology and innervation of the midgut and hindgut of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata)

Zoological Science, aceito em 16. XI. 2012 (vide anexo I).

Zoological Science


 ZOOLOGICAL
SCIENCE


General morphology and innervation of the midgut and hindgut of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata)

Journal:	Zoological Science
Manuscript ID:	ZS-O-2012-0170.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Oct-2012
Complete List of Authors:	Martinez-Pereira, Malcon; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology Franceschi, Raehaela; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology Antunes, Graziane; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology Coelho, Bárbara; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology Achaval, Matilde; Federal University of Rio Grande do Sul, Morphological Sciences Zancan, Denise; Federal University of Rio Grande do Sul, Physiology
Keywords:	enteric nervous system, Stomatogastric nervous system, Visceral innervation, Subesophageal ganglia, land snail


 SCHOLARONE[®]
Manuscripts

Zoological Society of Japan

General morphology and innervation of the midgut and hindgut of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata)

Malcon Andrei Martinez-Pereira^{1,2}; Raphaela da Cunha Franceschi^{1,2}; Graziane de Freitas Antunes²; Bárbara Paranhos Coelho²; Matilde Achaval^{1,3}; Denise M. Zancan^{1,2*}

¹Neuroscience Graduate Program, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratory of Comparative Neurobiology, Department of Physiology, ICBS, UFRGS, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

³Department of Morphological Science, ICBS, UFRGS, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Short Title: **The mid- and hindgut of *M. abbreviatus***

***Corresponding author**

Telephone: +55-51-33083305. Fax: +55-51-33083155. E-mail: zancan@ufrgs.br

Discipline submission: Neurobiology

Number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables): 34

Number of figures: 4

Abstract The morphology and innervation of the midgut and hindgut of the giant land snail *Megalobulimus abbreviatus* were described for the first time. The midgut (stomach and intestine) and hindgut (rectum and anus) are innervated by the subesophageal ganglia, through the gastrointestinal branch (originated from the visceral nerve) and the rectum-anal nerve, respectively. Backfilling through these nerves revealed neuronal bodies mainly in the right parietal and visceral ganglia. The enteric plexuses of the midgut and hindgut are formed by extensive axonal networks and several neuronal somata arranged in clusters or as isolated cells. The gastrointestinal branch and the rectum-anal nerve innervate directly the enteric plexuses of the intestine and the hindgut, respectively. However, the outer wall of the stomach has a stomatogastric nervous system, which consists of four ganglia: stomatogastric, gastric, cardiac and pyloric. Fibers of the gastrointestinal branch project to these ganglia. Anterograde tracing from stomatogastric system ganglia revealed that the enteric plexus of the stomach is innervated only by these peripheral ganglia. Anterograde tracing of gastrointestinal branch did not result in labeling in the enteric plexus of the stomach. Therefore, the midgut and hindgut of *M. abbreviatus* is controlled by an intrinsic innervation, constituted by the submucous and myenteric plexuses, which is innervated directly by neurons from the subesophageal ganglia or indirectly via the stomatogastric nervous system (for the stomach).

Keywords: Enteric nervous system, Stomatogastric nervous system, Digestive system, Subesophageal ganglia, Land snail

Introduction

Gastropods exhibit different feeding habits and consume several types of food. Consequently, structural modifications are often well-marked in their alimentary system and a correlation can be established between the food, feeding habits and structural changes. From

the functional perspective, the digestive system of stylummatophorans can be divided into three regions: (i) reception, conduction and storage of food; (ii) digestion and absorption of nutrients; and (iii) formation and elimination of feces (Dimitriadis, 2001). Comparisons have been made based on the gross anatomy of the alimentary tract in various stylummatophorans (Tillier, 1989). The histology of the digestive tract has also been studied in several pulmonate snails (Carriker, 1946; Ghose, 1963; Hyman, 1967; Walker, 1972; Runham, 1975). However, there is little information available on the intramural innervation of the gastrointestinal tract (GI) and its connections with the central ganglia. The majority of the data refers to the foregut innervation.

The molluscan digestive system is controlled by the central nervous system (CNS) and by the enteric nervous system (ENS). The visceral ganglion and the buccal ganglia send nerves to the digestive system. The buccal ganglia innervate the foregut, while the visceral ganglion innervates the midgut (stomach and intestine) and hindgut (rectum and anus) (Bullock and Horridge, 1965; Bulloch and Ridgway, 1995; Dorsett, 1986; Chase, 2002). However, some axon fibers that innervate the digestive tract via visceral nerves could originate from other subesophageal ganglia. Although the axonal tract tracing has been less frequently used in studies on digestive nervous control in mollusks, this procedure may be useful to clarifying this question.

In arthropods (Hartenstein, 1997; Roberts, 1997; Ayali, 2004; Katz, 2007) and annelids (Barna et al., 2001; Ierusalinsky and Balaban, 2006) the intermediate control level of the GI is called the stomatogastric nervous system. The STNS consists of ganglia distributed in the gut wall. However, there is some controversy regarding the existence of peripheral ganglia intermediating the CNS and ENS in gastropods. In gastropods, the term “stomatogastric nervous system” (STNS) was attributed to the buccal ganglia that innervate the GI through the esophageal nerves (Lacaze-Duthiers, 1898; Paravicini, 1898; Alexandrowicz, 1912;

Russell, 1929). The STNS is described in different species of *Aplysia* as a circular nerve ring, the stomatogastric ring, around the boundary between the crop and the triturating stomach (Fujisawa et al., 1999). Together with the nerve ring, cell bodies are located side-by-side, occasionally forming clusters (Furukawa et al., 2001; Ito and Kurokawa, 2007; Morishita et al., 2003). Nevertheless, Fujisawa et al. (1999) consider the stomatogastric ring as a component of the ENS. We are not aware of hodological studies that clarify whether the innervations of the enteric system of the midgut and hindgut of the pulmonate gastropods are performed directly by the CNS or via peripheral ganglia.

In the digestive tract of gastropods a complex ENS containing many neurons and projecting axons is described (Ito and Kurokawa, 2007; Kurokawa et al., 2008). The ENS has been shown to have an important role in the regulation and coordination of motility, absorption and secretion of the digestive tract in gastropods (Röszer, et al. 2004; Okamoto and Kurokawa, 2010). Data from *Helix* (Hernádi et al., 1998; 2000), *Aplysia* (Ito and Kurokawa, 2007) and studies reviewed by Bullock and Horridge (1965) primarily involve the foregut morphology.

Megalobulimus abbreviatus is a common south Brazilian giant land snail that has for long been used as an experimental model for neurobiological studies, with emphasis on its central nervous system (De Fraga et al., 2004, 2010; Santos et al., 2002; Kalil-Gaspar et al., 2007; Rigon et al., 2010; Swarowsky et al., 2005; Zancan et al., 1997, among others). Although the advantages of using *M. abbreviatus* in physiological experiments were recognized long ago (Jaeger, 1965), its peripheral nervous system has received less attention. The morphology of GI innervation in *Megalobulimus abbreviatus* is the starting point for understanding the yet undescribed neural control of digestive functions for the members of Strophocheilidae. In order to localize the central neurons which are projecting to stomach, intestine and rectum the nerves are backfilled. As to the best our knowledge there are no hodological studies in pulmonate gastropods clarifying whether the midgut is innervated directly by neurons from the CNS or whether, in fact, there are

peripheral intermediate neurons between central and enteric neurons, a neural tracer was employed toward the stomach. The large size of this species as compared with others land snails facilitates this experimental approach. The present study describes the innervation of the digestive system constituted by three levels of neural elements and presents a comparative analysis of histological results from other groups of Gastropoda.

Materials and Methods

Animals

Adult *Megalobulimus abbreviatus* (Bequaert, 1948) (MNRJ 13283) previously cited incorrectly as *Megalobulimus oblongus* or *Strophocheilus oblongus*, were collected in Charqueadas county (29°57'17''S - 51°37'31''W), Rio Grande do Sul, Brazil. Animals with shells measuring 3.69 ± 0.24 cm wide (mean \pm standard error) and 7.15 ± 0.50 cm long and weighing 52.36 ± 1.49 g were used. The animals were kept in terraria for two weeks, under standard conditions (22 - 26°C; 12 h / 12 h light: dark cycle and fed vegetable and water *ad libitum*). The snails were anesthetized by immersion in a menthol-saturated solution, diluted in physiological solution for the species (Jaeger, 1962) for 40 min. All animal procedures were in accordance with the Brazilian law (Federal Law n° 11.794/2008) on procedures for the scientific use of animals.

Experimental procedures

Morphology

Under a surgical microscope, the gastrointestinal branch (Gb) of the common visceral nerve (Vn) and rectum-anal nerve (Rn) of 20 animals were dissected. For light microscopy, the stomach, intestine and rectum from 12 animals were fixed in Bouin's fluid (4 h), dehydrated in ethanol graded series (70 % to absolute) and embedded in paraffin. Serial

sections (10 μm) were cut on a Leica Microtome (RM 2125) and stained with hematoxylin-eosin or Heidenhain's hematoxylin. Some sections were submitted to histochemical procedures to detect carbohydrates in the mucosal layer using periodic acid-Schiff procedure (Pearse, 1972). The stomach and intestine from 4 animals were fixed in formol-calcium (4 h), cryoprotected in 15 % and 30 % sucrose diluted in 0.1M phosphate buffer (PB) pH 7.4. Cryostat tissue sections (Micron HM 505E, 10 μm) were obtained and stained using the Sudan Black method (Pearse, 1972) to detect lipid-content-cells in the mucosal layer. To describe the ENS morphology of the stomach, intestine, rectum and anus, whole-mount preparations or cryostat sections (50 μm) were stained by the Bielschowsky-Gros silver diammine impregnation technique (according to Garven and Gairns, 1952, n = 12) or methylene blue method (Müller, 1989; n = 6). Histological sections and whole-mount preparations were analyzed and photographed with a Nikon Optiphot-2 microscope.

Tracing experiments

Retrograde tracing

The periesophageal ring was dissected with the connectives and commissures intact. These ganglia were placed in a well containing physiological solution. The cut end of the Gb or Rn were immersed in another well and isolated from the central ganglia with a vaseline barrier. Three preparations were made, adding different tracers to the well to obtain backfilling toward the subesophageal ganglia: **(1)** A solution of cobalt chloride (50mM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma, St. Louis, MO) diluted in snail saline and combined with 0.1% bovine albumin (Sigma) was added to the well containing the cut nerve endings of Gb (n = 14) or the Rn (n = 6). The preparation was maintained in a humid chamber at 4°C for 96 h (Gb) or 72 h (Rn). The snail saline was changed daily. The entire preparation was washed in snail saline and the cobalt ion was precipitated with 0.2% ammonium sulphide. The ganglia were fixed

for 2h in Carnoy's solution, cryoprotected in 15% and 30% sucrose diluted in 0.1M phosphate buffer pH 7.4 (PB), and sectioned in a cryostat (Micron HM 505E, 50 μ m). The staining of the sections was intensified with silver nitrate, using a freshly prepared 8:1:1 mixture of solutions A (1% Triton X-100; sodium acetate; glacial acetic acid; silver nitrate): B (5% sodium tungstate): C (0.25% ascorbic acid) for 10 min (Davis, 1982). After washing, the sections were dehydrated in ethanol series, cleared in methyl salicylate and mounted with Canada balsam. **(2)** The cut nerve endings (n = 8 for Gb; n = 6 for Rn) were also backfilled with 4% Biocytin (Sigma) diluted in 0.05M Tris-HCl buffer 0.05 M, pH 7.4. It was applied as described above for the cobalt chloride backfilling. This preparation was maintained at 4°C for 72h (for Gb) or 48h (for Rn). After washing, the preparation was fixed in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer saline pH 7.4, cryoprotected in 15% and 30% sucrose and sectioned using a cryostat. Biocytin was visualized by means of an avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (Vector, Burlingame, CA) containing 0.5% diaminobenzidine (DAB; Sigma), 1% cobalt chloride and 1% nickel ammonium sulphate. In this solution 0.01% hydrogen peroxide was added. The sections were rinsed, transferred to gelatinized slides, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and mounted with Canada balsam. **(3)** Retrograde labeling with 4% horseradish peroxidase (HRP Type VI, Sigma) in 0.1 M KCl was applied to the Gb (n = 8) and Rn (n = 4) as previously described. The Vn and Rn preparations were incubated at 4°C for 48 h. After this, the material was fixed in a mixture of 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde in PB, for 1.5 h, cryoprotected in 15% and 30% sucrose, sectioned using a cryostat (50 μ m) and collected on gelatinized slides. To reveal the filled neurons, the sections were pre-incubated with 0.1% CoCl₂ in 0.1 M Tris-Maleate buffer, pH 7.6 (30 min), washed and then incubated in 0.05% DAB (45 min). In this solution, 0.2% hydrogen peroxide was added. The sections were rinsed, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and mounted with Canada balsam.

Another isolated ganglion was always included in the same pool with the central ganglion of interest, as a control for possible leakage of the tracer solution through the vaseline barrier.

The number of backfilled neurons obtained corresponds to the neurons consistently and coincidentally labeled by the three staining methods. Cobalt staining allowed the identification of the thinner axonal projections coming from the Gb more clearly than biocytin backfilling. Biocytin backfilling revealed the neuronal cell bodies at more distant regions from the Gb and the HRP method was the best to provide consistent results on the number of labeled neuronal cell bodies, due to its higher speed during axonal transport. Outline drawings of the labeled cell in the brain were made from ventral, medium and dorsal sections of the CNS. All the labeled neurons were located and classified according to the following size ranges: small (10 - 40 μm), medium (41 - 80 μm), large (81 - 120 μm) and giant (above 120 μm) neurons. The results were analyzed and photographed with a Nikon Optiphot-2 microscope.

Anterograde tracing

In order to determine the precise location of the Gb axonal terminals on the stomach wall, the stomach was dissected with the connection Gb-stomach intact. The proximal cut end of the Gb (n=6) was placed in a petri dish containing 20% Lucifer yellow CH (Sigma) diluted in distilled water. The stomach was maintained in physiologic solution and isolated from the tracer with a vaseline barrier. Current (from a 3 V transistor battery) was passed for 30 min between the electrodes placed in the Lucifer yellow well and in the stomach well (according to Oland et al., 1990). After this, the preparation was maintained in a humid chamber at 4°C for 72 h. Lucifer yellow was also added into the stomatogastric ganglion to trace its projections throughout the stomach (n = 4), using the same procedure described above. Following incubation, the stomach was sectioned using a cryostat (50 μm). The sections were collected

on gelatinized slides, mounted with glycerol and sodium carbonate and analyzed in an Olympus FV 1000 fluorescence microscope (380 - 425 nm excitation filter and 450 nm barrier).

Terminology

The histology of the digestive regions was described using the terminology outlined by Luchtel et al. (1997), while the macroscopic anatomy was described according to Tillier (1989) and Dimitriadis (2001). Components of the extrinsic and intrinsic innervation were described using the terminology outlined by Hyman (1967).

Results

Morphology of the midgut and hindgut

The stomach of *M. abbreviatus* is composed of a gastric crop or pro-ventricle, 1.48 ± 0.18 cm long (Fig. 1A), and gizzard, 1.01 ± 0.09 cm in diameter, (Fig. 1B). Besides the stomach, the midgut includes the intestine (12.68 ± 0.42 cm long) which is divided into pro-intestine, mid-intestine and post-intestine. The pro-intestine is characterized by two dorsal typhlosoles (Fig. 1C) of equal length that extend from the pylorus to the typhlosole valve (a short region with a slightly constricted diameter that precedes the mid-intestine). The anterior duct of the hepatopancreas opens in the dorso-lateral side of the pro-ventricle, near its limit with the muscular gizzard, while the posterior duct opens in the dorso-posterior side of the gizzard. The hindgut (6.13 ± 0.36 cm in length) consists of rectum and anus.

The GI wall is composed of four tunics: mucosa, submucosa, muscular and serosa. The mucosa has two layers, the columnar epithelium composed by mucous cells, cells with lipid droplets (sudan-positive), nerve cells with processes, and the lamina propria. The epithelium displays a brush border that is visible microscopically as a terminal bar on the apical side of

each cell. In the gizzard, the mucosal surface is covered by a thin cuticle. The intestinal mucosa (Figs. 1C) is highly folded, showing crypts and mucous cells with positive PAS granules, which decreased with amylase treatment (figure of PAS reaction not included), which are more numerous in the rectum (Fig. 1D). The submucosa is a loose connective tissue, containing a system of haemocoelic spaces, many neurons and axonal fibers. The muscular layer consists of circular (internal) and longitudinal (external) tunics, but in the gizzard there is a third muscular layer, obliquely disposed (Fig. 1B). The two sphincters of the stomach, the cardia and the pylorus, have well developed circular muscle. Neurons and nervous fibers are observed between the circular and longitudinal layers. The rectum presents only a circular layer and the anal muscular layer is well developed and forms a sphincter. The serosa display a loose connective tissue covered by a mesothelium.

Central innervation of the midgut and hindgut

The visceral ganglion (VG) emits five nerves: aortic, collumelar, posterior-pallial, common visceral (Vn) and rectum-anal (Rn). The midgut and the hindgut are innervated by the Vn and Rn, respectively (Fig. 2, schematic drawing). The Vn emits four branches: to the vagina-oviduct and spermoviduct; to the reno-pericardial region; the gastrointestinal branch (Gb) to the stomach and pro-intestine and a terminal branch to innervate the posterior lobe of the hepatopancreas and ovotestis. The anterograde labeling of the Gb with Lucifer yellow revealed axons of the Gb projecting through the serosa of the stomach and ending into the stomatogastric ganglion (stg) (Figs. 3E and 3F), The axonal processes of Gb are widely distributed into stg. No projections of the labeled branches were observed beyond this ganglion.

The Rn emerges on the right side of the Vn and projects toward the posterior limit of the pulmonary sac, where it emits a branch to supply the skin of this region and mantle, and then

divides into three branches: toward the collumellar muscle, to the rectum and to the anus which divides into axonal bundles around the anus.

Backfilled neuronal somata from the Gb and Rn are distributed throughout the subesophageal ganglia (Figs. 2C and 2D) and no labeled neurons were found in the cerebral ganglia of *M. abbreviatus*. However, labeled axonal fibers are observed in the neuropil of all central ganglia examined. Only those ganglion cells that are revealed simultaneously by the three tracers are counted. The maximum number of backfilled cell bodies obtained in each subesophageal ganglion is presented (Table 1 and 2), differentiated by the location of the cells in each ganglion. Backfilling of the Gb resulted in a total of 320 labeled neurons located in all subesophageal ganglia (Table 1). Most of the Gb-labeled neurons are located in the right parietal (RPa), visceral (VG, Fig. 2D) and right pedal (RPe) ganglia, corresponding to 74.4% of total backfilled neurons from Gb. Backfilling of the Rn resulted in a maximum of 387 labeled neurons distributed throughout the subesophageal ganglia, except for the right pleural ganglion (Table 2). Most of the neurons backfilled from the Rn are also located in the RPa (Fig. 2E), VG (Figs. 2E and 2F) and RPe, constituting 60% of the total. Although it was not possible to use double staining techniques in the present work, based on the location and size of the labeled neuronal somata in *M. abbreviatus*, several groups of neurons backfilled from Gb seem to coincide with neuronal clusters backfilled from Rn. By overlaying the maps with the position of neurons in different planes (ventral, medium and dorsal) of the horizontal section of the subesophageal ganglia, we estimate that about 30% of the labeled neurons appear to be the same neurons sending axons to both Gb and Rn.

The stomatogastric nervous system (STNS) of *M. abbreviatus*

The interconnected peripheral ganglia located in the stomach wall of *M. abbreviatus* are referred to as the STNS in the present study. The STNS is formed by 25 to 31 neurons

organized in four ganglia (Fig. 3, scheme). The largest ganglion of the STNS is located in the medium-dorso-posterior region of the gizzard and is referred to as the stomatogastric ganglion (stg, Fig. 3A and 3B). The stg contains 11 to 14 neurons of variable diameter (20 μm – 100 μm). Two smaller ganglia, each containing 4 to 5 neurons (20 – 40 μm), are situated between the pro-ventricle and the gizzard (gastric ganglion, Fig. 3D) and between the gizzard and the pro-intestine (pyloric ganglion, Fig. 3D). These two ganglia are interconnected by a short and delicate neural connective. In addition, at the boundary between the crop and the pro-ventricle there is a cardiac ganglion containing 5 to 7 neurons (20 – 40 μm) (Fig. 3C). Two nerves emerge from the stg: the stomatogastric nerve (the largest of them) ramifies into three branches that connect to the other ganglia (Figs. 3A and 3B); and the dorsal pro-ventricular nerve (Figs. 3C and 3D) extends to the stg toward the gastric ganglion. The dorsal pro-ventricular nerve emits two lateral nerves on the pro-ventricle wall. The stg also emits short gastric branches to supply the gizzard wall. The injection of Lucifer yellow into stg reveals axonal fibers that project to the enteric nervous system of the gizzard, and connect with the neuronal cell bodies of the myenteric plexus (Figs. 3G and 3H). The paired superior esophageal nerves originating from the buccal ganglia arrive at the cardiac ganglion (Fig. 3C).

The arrangement of the enteric nervous system (ENS) in the midgut and hindgut

The ENS of the midgut and hindgut in *M. abbreviatus* is a neural-network formed by neuronal cell bodies and its axons and can be divided into two interconnected components: the submucosal (SP) and the myenteric plexuses (MP) (Fig. 4A). The enteric neurons of the SP and MP vary in size: small (10 – 15 μm), medium (16 - 20 μm) and large neurons (21 – 50 μm).

Other neural elements found are the intraepithelial cells and fusiform cells (2.5 – 5 μm in diameter). The intraepithelial cells (Fig. 4G) are columnar-shaped; they are located between

the cells of the digestive epithelium. The apical region of some of these cells seems to be exposed to the GI lumen, possibly by means of microvilli or cilia, while other intraepithelial cells are not exposed to the lumen. Both cells have several basal processes in the epithelial basement membrane, contributing to form a plexus within the subepithelium and toward the lamina propria of the mucosa and hemal sinuses. The fusiform cells are present predominantly in MP, they are spindle-shaped and have a large oval nucleus, few cytoplasm and two or more dendritic-like processes (bipolar or multipolar aspects). The multipolar fusiform (Fig. 4H) cell show branched processes connecting to the enteric plexuses in the space between the circular and longitudinal muscle layers, while the bipolar-type (Fig. 4I) are mainly associated with the long axis of surrounding smooth muscle cells.

The SP is made up of an extensive nervous layer within the connective tissue adjacent to the mucosa, and is formed by abundant thin fibers and a few scattered neuronal cell bodies (Figs. 4B, 4D and 4E). The MP is located between the circular and longitudinal muscular layers and is made up of single neurons (Fig. 4D) or cluster of neurons (Fig. 4E) that innervate the muscle cells. Neuronal processes from both SP and MP interconnect to each other and some projections of these plexuses seem to connect with the intraepithelial cells.

In the transition between the pro-ventricle and the crop, the MP and SP have a greater number of neurons and nerve fibers than the pyloric region. In both plexuses, the majority of the neurons are unipolar (Fig. 4B, 4C and 4D). However, multipolar neurons are also found in groups or isolated. In the transition between the pro-ventricle and gizzard another great density of enteric neurons is observed. The interconnections between the MP and SP neurons in this region form an irregular polygon-shaped network composed of both single neurons and ganglia. At the opening of the hepatopancreas ducts, the neural network shows a radial arrangement. The ENS of the gizzard has a smaller number of neurons than the other segments of the GI. Its neural network has nerve fibers scattered between the muscular fibers

and in the submucosa (Fig. 4F). The enteric nervous network of the intestine presents a uniform topographical arrangement that extends from the pro-intestine to the rectum. However, in the pro-intestine, branches of thick nerve fibers extend along the entire length of the typhlosoles (Fig. 4F), but no neuronal somata are observed within these structures. In the mid- and post-intestine the neurons are organized in clusters of predominantly small unipolar neurons, connected by branches of fibers of various calibers, constituting a regular and continuous geometric network, interconnecting the MP and SP. This arrangement continues in the rectum.

Discussion

The GI in gastropods presents great variability in their morphological organization, which reflects the different feeding habits. In the stylommatophora *M. abbreviatus*, the GI is longer and often looped or coiled, which is typical of herbivores (Hyman, 1967; Tiller, 1989). However, some characteristics of the GI in *M. abbreviatus* deserve attention by distinguishing its digestive system from the more widely studied stylommatophorans. The stomach of *M. abbreviatus* has two morphologically distinct regions: pro-ventricle (glandular) and gizzard (muscular), similar to other pulmonate gastropods (Morton, 1955; Leal-Zanchet et al., 1990). In *M. abbreviatus*, the pro-ventricle is the first portion of the stomach constituted of: a muscular sphincter that marks the transition to the esophagus, as described in the systellomatophora *Onchidella celtica* (Fretter, 1943), and constriction of the diameter in the pro-ventricle-gizzard transition and emission of the anterior duct of the hepatopancreas. The latter features are also described in *Theba pisana* (Roldan and Garcia-Corrales, 1988). The gizzard of *M. abbreviatus* presents three muscle layers, which is characteristic of this region in some pulmonate gastropods (e.g., *L. stagnalis*, Carriker and Bilstad, 1946; *T. pisana*, Roldan and Garcia-Corrales, 1988). In systellomatophorans, the pylorus is described as being

part of the intestine and referred to the typhlosolear intestine (Leal-Zanchet et al., 1990), though in *M. abbreviatus* it probably acts in coordination with the gizzard, as has been proposed for pulmonate gastropods (Scott, 1939; Carriker and Bilstad, 1946; Rigby, 1963). The pro-intestine has two typhlosoles of equal length, unlike that described in other pulmonate gastropods (Leal-Zanchet et al., 1990; Dimitriadis, 2001). The mid-intestine of the *M. abbreviatus* does not have ridges on the lumen as observed in other stylommatophorans (Dimitriadis, 2001) and the caecum is absent, in contrast to the descriptions of some systellomatophorans (Fretter, 1943) and basommatophorans (Carriker and Bilstad, 1946; Boer and Kits, 1990). The histology of the intestine is also similar to that described in the pulmonate gastropods, with the circular layer being predominant in relation to the longitudinal layer (Luchtel et al., 1997). The rectum of *M. abbreviatus* differs from other gastropods (Howells, 1942; Carriker and Bilstad, 1946; Ghose, 1963; Roldan and Garcia-Corrales, 1988) by absence of longitudinal ridges on the wall, having only a thin circular musculature, as in Veronicellidae (Hoffmann, 1925).

The innervation of the midgut is variable in gastropods. In *Helix pomatia*, *Aplysia*, *A. fulica* and *Arion ater* the innervation of the stomach is supplied by the buccal ganglia, via gastric nerves (Schmalz, 1914; Bang, 1917; Roach, 1968; Schwarz and Suswein, 1984, 1986) or the common crop nerve (Abeysekera and Breckenridge, 1979), while the innervation of the intestine is generally supplied by the intestinal nerve from the visceral ganglion (Schmalz, 1914; Scott, 1939; Nisbet, 1961; Ghose, 1962; Bagust et al., 1979; Elekes et al., 1985; Kruatrachue et al., 1993; Antkowiak and Chase, 2003). In *M. abbreviatus*, the superior esophageal nerves (emitted by the buccal ganglia) project to the cardiac ganglion in the pro-ventricle, but do not go to the other portions of the stomach, as described in other pulmonate gastropods (Schmalz, 1914; Bullock and Horridge, 1965; Hyman, 1967). The stomach and intestine of *M. abbreviatus* are innervated by the Gb, which does not emerge directly from the

visceral ganglia, but as a branch of the Vn, as described in *Succinea putris* (Cook, 1966) and *Arion ater* (Roach, 1968).

The denomination of the five nerves from the VG of *M. abbreviatus* follows that suggested for *Strophocheilus lorentzianus* (Scott, 1939) and other stylommatophorans (Hyman, 1967). The term common visceral nerve was adopted as it better describes the complexity of the innervation, which includes heart, kidney, hepatopancreas and part of the reproductive organs, skin, as well as the stomach and intestine. The name "intestinal" used for this nerve in *Helix pomatia* and *H. aspersa* (Schmalz, 1914; Bagust et al., 1979; Elekes et al., 1985), *S. putris* (Cook, 1966) and *A. fulica* (Abeysekera and Breckenridge, 1979) is not consistent with the broad innervation. In *M. abbreviatus*, the Gb emits various branches along the wall of the stomach and intestine, as described in *A. ater* (Roach, 1968). The innervation of the hindgut of *M. abbreviatus* by the Rn is also similar to that described for the studied gastropods (Schmalz, 1914; Bang, 1917; Scott, 1939; Bullock and Horridge, 1965; Hyman, 1967; Abeysekera and Breckenridge, 1979; Kruatrachue et al., 1993).

The pair of parietal ganglia and visceral ganglion control the midgut, reproductive organs, pneumostome, renopericardial cavity and mantle (Dorsett, 1986). However, in the pulmonate gastropods, the control of visceral functions by CNS is mostly investigated in relation to the cardio-renal, respiratory and reproductive systems (Bagust et al., 1979; Pin and Gola, 1984; S.-Rózsa, 1987; Vehovszky and Elekes, 1985; Antkowiak and Chase, 2003). The neurons that control the visceral functions have been identified through the visceral nerve trunk labeling (Vehovszky and Elekes, 1985), but not through its branches, Gb and Rn, as it was made in the present study. In *M. abbreviatus*, the Gb is constituted by neurons of all subesophageal ganglia as revealed by backfilling of this branch. The neurons of the RPa, VG and RPe ganglia are the majority of the Gb axons. The Rn consists of axons from a greater number of subesophageal neurons than the Gb, which is confirmed by the larger diameter of

Rn. The labeled neurons can be motoneurons (efferent outputs), first or second order sensory neurons (afferent inputs), or a multifunctional neuron with afferent and efferent projections, as described in the visceral ganglion of *Helix pomatia* (Elekes et al., 1985; S.-Rózsa, 1987).

The neurochemical studies already performed in the CNS of this species allow some correlations with the present mapping. The group of neurons found along the posterior margin of the VG of *M. abbreviatus*, backfilled from Gb and Rn, coincides with the group identified as serotonergic neurons in this species (Zancan et al., 1997). The pair of giant pedal neurons previously identified as serotonergic in *M. abbreviatus* (Zancan et al., 1997; Swarowsky et al., 2005) were also backfilled from Gb. These neurons have already been proposed as modulators of locomotion, but as this pair of neurons was consistently backfilled from Gb, they may be innervating different peripheral structures to control coordinated functions. In the nervous system of mollusks, multimodal neurons with direct synaptic connections to both visceral organs and somatic muscles have been identified (Zhuravlev et al., 2001). Neurons of visceral and parietal ganglia of *Achatina fulica* (Munoz et al., 1983; Takeuchi et al., 1996; Bugai et al., 2005) project axonal pathways simultaneously to visceral, right parietal and pedal nerves.

In some invertebrates, rhythmic activity of the alimentary canal is coordinated by a visceral or stomatogastric nervous system (STNS), and innervation from the CNS is not essential for basic motility of the alimentary tract, although the visceral neural network is also supplied by extrinsic fibers originating from the CNS (Bullock and Horridge, 1965). The first descriptions of the stomatogastric ganglia in gastropods refer to the buccal ganglia that innervate the GI through the esophageal nerves (Lacaze-Duthiers, 1898; Paravicini, 1898; Alexandrowicz, 1912; Russell, 1929). In *Limax cinerea*, there is a ganglionic plexus in the outer side of the intestine, which is innervated by CNS (Stefanelli, 1932a, b, 1934a, b). In addition, on the dorsal wall of the stomach of *Arion ater* and *A. fulica*, a ganglionic plexus innervated by gastric nerves from the buccal ganglia was also described (Roach, 1968; Abeyesekera and Breckenridge, 1979). More recently, the STNS was described as a

nervous ring lying between the crop and gizzard in different species of *Aplysia*, and it was considered as a component of the ENS (Fujisawa et al., 1999, Furukawa et al., 2001, Ito and Kurokawa, 2007; Morishita et al., 2003). In *Aplysia*, the neurons located on the outer surface of the GI (stomatogastric ring) generate rhythm-bursting activities, in absence of the CNS (Ito and Kurokawa, 2007). Unlike the STNS of *M. abbreviatus*, the stomatogastric nervous system of *Aplysia* receives innervation from buccal ganglia. However, in *M. abbreviatus* the STNS is not a component of ENS, it is part of the peripheral nervous system and includes four clusters of neurons or ganglia (stomatogastric, cardiac, gastric, pyloric) on the wall of the stomach. The largest ganglion, the stomatogastric, is innervated by the Gb from the subesophageal complex. This pattern of organization resembles the stomatogastric system described for crustaceans (Roberts, 1997). The stomatogastric ganglia of crustaceans (Roberts, 1997) and earthworms (Barna et al., 2001) also contain few neurons as observed in *M. abbreviatus*. Given the extensive projections of the STNS to stomach regions in *M. abbreviatus*, it is reasonable to consider that stomach motility is probably controlled by SNTS motoneurons. As the anterograde tracing of Gb did not reveal labeling in the enteric plexus of the stomach, the influence of CNS in the stomach motility is probably indirect, through the STNS. Nevertheless, electrophysiological and neurochemical approaches are necessary to determine the role of the STNS in the GI in gastropods.

The ENS in *M. abbreviatus* consists of two parallel neural networks, the SP and the MP, which extend throughout the GI to the anus, as described in other gastropods (Lacaze-Duthiers, 1898; Paravicini, 1898; Alexandrowicz, 1912; Russell, 1929; Stefanelli, 1932a, 1934a, b; Ábrahám, 1940, 1983; Jabonero and Rodrigo, 1966). The greater density of neurons in the gastroesophageal junction of *M. abbreviatus* is also observed in other gastropods (*A. ater*, Roach, 1968; *Amphibola crenata*, Pilkington, 1981, 1982; *Aplysia*, Ito and Kurokawa, 2007) and this more developed neural plexus can indicate a mechanism to control food transport through the cardia. The smaller number of somata in the MP and SP found in the gizzard of *M. abbreviatus* is possibly due to the presence of an STNS that could play a leading role in gastric functions. The unipolar-type neuron predominates in the MP and SP in *M. abbreviatus*, although multipolar and bipolar neurons can also be found. The

predominance of unipolar neurons in the ENS has been described in gastropods (Stefanelli, 1932a, b, 1934a, b; Ábrahám, 1940, 1983; Jabonero and Rodrigo, 1966).

We found intraepithelial cells in the GI mucosa of *M. abbreviatus*. These cells are similar to the described in other gastropods (Zaitseva 2006; Zaitseva and Filimova 2006), which are called neuron-like intraepithelial cells. These intraepithelial cells are sparsely arranged among the epithelial cells of the mucosa in the digestive tract of opisthobranchs and pulmonate mollusks. These authors suggest that neuron-like intraepithelial cells could be receptor cells. Even though the morphological features suggest a sensorial receptor function for these intraepithelial cells, as proposed for *Achatina fulica* and *Littorina littorea* (Zaitseva 2006; Zaitseva and Filimova 2006; Zaitseva et al 2009), data from ultrastructural and neurochemical studies of the ENS in *Megalobulimus abbreviatus* are needed to better evaluate this hypothesis.

The existence of fusiform cells in the ENS of *M. abbreviatus* is not mentioned in the literature on gastropods. We are not aware of studies that describe these cells in gastropods. Considering their morphological aspect (multipolar or bipolar fusiform cells) and location (single cells between the muscular fibers), we can infer that these cells resemble the interstitial cells of Cajal of the GI of vertebrates. However, an immunohistochemical approach is essential to elucidate this hypothesis.

In conclusion, the midgut and the hindgut of *M. abbreviatus* have two intramural plexuses, submucous and myenteric, which extend throughout the midgut and the hindgut. These enteric plexuses in the intestine receive direct extrinsic innervation via gastrointestinal branch, constituted by neurons of the seven different subesophageal ganglia. The enteric plexus of hindgut is innervated via rectum-anal nerve, constituted by a greater number of subesophageal neurons than the midgut. The stomach of *M. abbreviatus*, divided into the pro-ventricle and gizzard, also has the same intrinsic plexuses, however these are innervated indirectly by the central nervous system. The stomach presents a system composed by four clusters of neurons, or ganglia, constituting the stomatogastric system, which receives central

innervation and projects to intramural plexuses. The cerebral ganglia do not directly innervate the midgut and the hindgut of *Megalobulimus abbreviatus*, unlike its acknowledged role in the innervation of the foregut in gastropods. The organization of the GI innervation revealed in this study will facilitate further investigations of the neural control of the snail digestive system.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Brazilian Coordination of Improvement of Higher Education (Capes) and Brazilian National Research Council (CNPq). We are grateful to Professor Paulo Ivo H. de Bittencourt Jr. for the use of the fluorescence microscope.

References

- Abeyesekera AMD, Breckenridge WR (1979) The nervous system of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). *Ceylon J Sci (Bio Sci)* 13: 89-107
- Ábrahám A (1940) Die innervation des darmkanals der gastropoden. *Cell Tissue Res* 30: 273-296
- Ábrahám A (1983) Light- and electron-microscopic investigations into the gastro-intestinal nervous system of the vineyard snail (*Helix pomatia*). *Z Mikrosk Anat Forsch* 97: 688-704
- Alexandrowicz JS (1912) Zur kenntnis des sympatischen nervensystems einiger wirbellosen. *Z allg Physiol* 14: 358-376
- Antkowiak T, Chase R (2003) Sensory innervation of the ovotestis in the snail *Helix aspersa*. *J Exp Biol* 206: 3913-3921
- Ayali A (2004) The insect frontal ganglia and stomatogastric patterns generator networks. *Neurosignals* 13: 20-36

- Bagust J, Fitzsimons JTR, Kerkut GA (1979) Evidence for integrating activity in the isolated intestinal nerve of *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol A* 62: 397-408
- Bang T (1917) Zur morphologie des nervensystems von *Helix pomatia* L. *Zool Anz* 48: 281-291
- Barna J, Csoknya M, Lázás Zs, Barthó L, Hámori J (2001) Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Annelida). *J Neurocytol* 30: 313-325
- Bequaert JC (1948) Monograph of the family Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial mollusks. *Bull Mus Comp Zool Harvard* 100: 1-210
- Boer HH, Kits KS (1990) Histochemical and ultrastructural study of the alimentary tract of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J Morphol* 205: 97-111
- Bugai VV, Zhuravlev VL, Safonova TA (2005) Neuroeffector connections of giant multimodal neurons in the African snail *Achatina fulica*. *Neurosci Behav Physiol* 35: 605-613
- Bulloch AGM, Ridgway RL (1995) Comparative aspects of gastropod neurobiology. In "The Nervous Systems of Invertebrates. An Evolutionary and Comparative Approach" Ed by O Breidbach, W Kutsch, Birkhäuser Verlag, Basel, pp 89-113
- Bullock TH, Horridge GA (1965) Structure and Function in the Nervous Systems of Invertebrates vol 2, Freeman, San Francisco, pp 1283-1386
- Carriker MR (1946) Observations on the functioning of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Biol Bull* 91: 88-111
- Carriker MR, Bilstad NM (1946) Histology of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* Say. *Trans Am Microsc Soc* 65: 250-275
- Chase R (2002) Behavior and its neural control in gastropod mollusks, Oxford University Press, New York, pp 17-163

- Cook H (1966) Morphology and histology of the central nervous system of *Succinea putris* (L). Arch Neerl Zool 17: 1-72
- Davis NT (1982) Improved methods for cobalt filling and silver intensification of insect motor neurons. Stain Technol 57: 239-244
- De Fraga LS, Da Silva RSM, Achaval M, Zancan DM (2004) Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. J Exp Zool 301: 968-978
- De Fraga LS, Da Silva RSM, Zancan DM (2010) Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system. J Exp Zool A 313: 539-547
- Dimitriadis VK (2001) Structure and function of the digestive system in stylommatophora. In “Biology of Terrestrial Mollusks” Ed by G. Barker G, CABI Publishing, Cambridge, pp 237-257
- Dorsett DA (1986) Brain to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. In “The Mollusca Vol 9 Neurobiology and Behavior Part 2” Ed by KM Wilbur, Academic Press, New York, pp 101-187
- Elekes K, Rózsa KS, Vehovszky A, Hernádi L, Salánki J (1985) Nerve cells and synaptic connections in the intestinal nerve of the snail *Helix pomatia* L. Cell Tissue Res 239: 611-620
- Fretter V (1943) Studies on the functional morphology and embryology of *Onchidella celtica* (Forbes and Hanley) and their bearings in its relationships. J Mar Biol Assoc UK 25: 685-720
- Fujisawa Y, Furukawa Y, Ohta S, Ellis TA, Dembrow NC, Li L, Floyd PD, Sweedler JV, Minakata H, Nakamaru K, Morishita F, Matsushima O, Weiss KR, Vilim FS (1999) The *Aplysia mytilus* inhibitory peptide-related peptides: identification, cloning, processing, distribution and action. J. Neurosci 19: 9618-9634

- Furukawa Y, Nakamaru K, Wakayama H, Fujisawa Y, Minakata H, Ohta S, Morishita F, Matsushima O, Li L, Romanova E, Sweedler JV, Park JH, Romero A, Cropper EC, Dembrow NC, Jing J, Weiss KR, Vilim FS (2001) The enterins: a novel family of neuropeptides isolated from the enteric nervous system and CNS of *Aplysia*. *J Neurosci* 21: 8247-8261
- Garven HSD, Gairns FW (1952) The silver diammine ion staining of peripheral nerve elements and the interpretation of the results: with a modification of the Bielschowsky-Gros method for frozen sections. *Exp Physiol* 37: 131-142
- Ghose KC (1962) The nervous system of *Achatina fulica* Browdich. *Ann Zool* 4: 25-37
- Ghose KC (1963) The alimentary system of *Achatina fulica*. *Trans Am Microsc Soc* 82: 149-167
- Hartenstein V (1997) Development of the insect stomatogastric nervous system. *Trends Neurosci* 20: 421-427
- Hernádi L, Erdelyi L, Hiripi L, Elekes K (1998) The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*. *J Neurocytol* 27:761-775
- Hernádi L, Erdelyi 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: 177-187
- Hoffmann H (1925) Die Vaginuliden. Ein Beitrag zur Kenntnis ihre Biologie, Anatomie, Systematik, geographischen Verbreitung und Phylogenie (Fauna et Anatomie Ceylanica, III, Nr. 1). *Jena Z Naturw* 61: 1-374
- Howells HH (1942) The structure and function of the alimentary canal of *Aplysia punctata*. *Q J Microsc Sci* 83: 357-397
- Hyman LH (1967) *The Invertebrates Vol 6 Mollusca I*, McGraw-Hill, New York, pp 569-591

- Ierusalimsky VN, Balaban PM (2006) Immunoreactivity to molluscan neuropeptides in the central and stomatogastric nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Cell Tissue Res* 325: 555-565
- Ito S, Kurokawa M (2007) Coordinated peripheral neuronal activities among the different regions of the digestive tract in *Aplysia*. *Zoo Sci* 24: 714-722
- Jabonero V, Rodrigo J (1966) Mikroskopische studien ueber die innervations des verdauungstraktes. II. Weitere beobachtungen über die ganglienzellen von typus I nach Dogiel. *Trab Inst Cajal Invest Biol* 58: 199-222
- Jaeger CP (1962) Physiology of Mollusca. II. Action of serotonin and other amines on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp Biochem Physiol* 23: 159-162
- Jaeger CP (1965) Giant snail is used for muscle studies. *Nat Hist* 74: 26-27
- Kalil-Gaspar P, Marcuzzo S, Rigon P, Molina CG, Achaval M (2007) Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: Evidence for TRPV-1 signaling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comp Biochem Physiol A* 148 286–291
- Katz PS (2007) Evolution and development of neural circuits in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 17: 59-64
- Kruatrachue M, Upatham ES, Seehabutr V, Chavadej J, Sretarugsa P, Sobhon P (1993) General anatomy and histology of the nervous system in *Achatina fulica*. *J Sci Soc Thailand* 19: 1-24
- Kurokawa M, Ito S, Okamoto T (2008) Activities and functions of peripheral neurons in the enteric nervous system of *Aplysia* and *Lymnaea*. *Acta Biol Hung* 59: 65-71
- Lacaze-Duthiers H (1898) Les ganglions dits palléaux et le stomatogastrique de quelques gastéropodes. *Arch Zool Exp Gen* 6: 331-428
- Leal-Zanchet AM, Thomé JW, Hauser J (1990) Microanatomia e histologia do sistema

- digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835) (Molusca: Gastropoda: Veronicellidae) – III. Tubo digestivo (do estômago ao reto). *Caatinga* 7: 76-104
- Luchtel DL, Martin AW, Deyrup-Olsen I, Boer HH (1997) Gastropoda: Pulmonata. In “Microscopic Anatomy of Invertebrates Vol 6B Mollusca II” Ed by FW Harrison, AJ Kohn, Wiley-Liss, New York, pp 459-718
- Morishita F, Nakanishi Y, Sasaki K, Kanemaru K, Furukawa Y, Matsushima O (2003) Distribution of the *Aplysia* cardioexcitatory peptide, NdWamide, in the central and peripheral nervous systems of *Aplysia*. *Cell Tissue Res* 312: 95-111
- Morton JE (1955) The functional morphology of the British Ellobiidae (Gastropoda, Pulmonata) with special reference to the digestive and reproductive systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 230: 89-160
- Müller T (1989) Local supravital staining with methylene blue as marking technique for neurons. *Z Mikrosk Anat Forsch* 103: 967-970
- Munoz DP, Pawson PA, Chase R (1983) Symmetrical giant neurones in asymmetrical ganglia: implications for evolution of the nervous system in pulmonate mollusks. *J Exp Biol* 107: 147-161
- Nisbet RH (1961) Some aspects of the structure and function of the nervous system of *Archachatina (Calachatina) marginata* (Swainson). *Proc R Soc Lond B* 154: 269-287
- Oland LA, Orr G, Tolbert LP (1990) Construction of a protoglomerular template by olfactory axons initiates the formation of olfactory glomeruli in the insect brain. *J Neurosci* 10: 2096-2112
- Okamoto T, Kurokawa M (2010) The role of the peripheral enteric nervous system in the control of gut motility in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Zool Sci* 27: 602-610
- Paravicini G (1898) Sulla minuta innervazione del canale digerente dell'*Helix pomatia*. *Boll Sci* 2-4

- Pearse AEG (1972) Histochemistry, theoretical and applied Vol 2. 3rd ed, Churchill Livingstone, London
- Pilkington JB (1981) Coordinated contractions of the anterior and posterior crop in *Amphibola crenata*. *Comp Biochem Physiol A* 69: 587-589
- Pilkington JB (1982) Electrically coupled stomatogastric neuron in the pulmonate snail, *Amphibola crenata*. *Comp Biochem Physiol A* 73: 395-399
- Pin T, Gola M (1984) Axonal mapping of neurosecretory *Helix* bursting cells functional aspects of peripheral multibranching axons. *Comp Biochem Physiol* 79: 611-620
- Rigby JE (1963) Alimentary and reproductive systems of *Oxychilus cellarius* (Müller) (Stylomm.). *Proc Zool Soc Lond* 144: 445-486
- Rigon P, de Castilhos J, Molina CG, Zancan DM, Achaval M (2010) Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the young and adult land snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Tissue Cell*, 42:307-13
- Roach DK (1968) Rhythmic muscular activity on the alimentary tract of the *Arion ater* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Comp Biochem Physiol* 24: 865-878
- Roberts PD (1997) Classification of the rhythmic patterns in the stomatogastric ganglion. *Neurosci* 81: 281-296
- Roldan C, Garcia-Corrales P (1988) Anatomy and histology of the alimentary tract of the snail *Theba pisana* (Gastropoda: Pulmonata). *Malacologia* 28: 119-130
- S.-Rózsa KS (1987) Organization of the multifunctional neural network regulating visceral organs in *Helix pomatia*. *Experientia* 43: 965-972
- Röszer T, Jenei Z, Serfözö Z, Czimmerer Z, Bánfalvi G (2004) Structural diversity of NADPH diaphorase-reactive enteral networks in Stylommatophora (Gastropoda, Pulmonata). *Invertebr Biol* 123: 128-135
- Runham NW (1975) Alimentary canal. In "Pulmonates Vol 1" Ed by V Fretter, J Peake,

- Academic Press, London, pp 53-105
- Russell L (1929) The comparative morphology of the Elysoid and Aeolidioid types of the molluscan nervous system. *Proc Zool Soc Lond* 14: 197-233
- Santos PCP, Gehlen G, Faccioni-Heuser MC, Zancan DM, Achaval M (2002) Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool* 83: 345-351
- Schmalz E (1914) Zur morphologie des nervensystems von *Helix pomatia*. *Z Wiss Zool* 111: 506-568
- Schwarz M, Suswein AJ (1984) A neural pathway for learning that food is inedible in *Aplysia*. *Brain Res* 294: 363-366
- Schwarz M, Suswein AJ (1986) Identification of the neural pathway for reinforcement of feeding when *Aplysia* learn that food is inedible. *J Neurosci* 6: 1528-1536
- Scott MIH (1939) Estudio anatomico del borus *Strophocheilus lorentzianus* (Döring) (Mollusca; Pulmonata) *Revta Mus La Plata Ser Zool* 1: 217-278
- Stefanelli A (1932a) Sul sistema nervoso intestinali dei *Limax* (cellule nervose com piú cilindrassi e circuito nervoso chiuso). *Arch Ital Anat Embriol* 30: 17-33
- Stefanelli A (1932b) Circuito nervoso chiuso nel sistema nervoso viscerale dei *Limax*. *Boll Zool* 3: 153-158
- Stefanelli A (1934a) Due chiari esempi di circuito nervoso chiuso. *Monit Zool Ital* 45: 49-51
- Stefanelli A (1934b) Nuove osservazione sul circuito nervoso chiuso in *Limax cinerea*. *Boll Zool* 5: 33-42
- Swarowsky A, Monteiro AF, Xavier LL, Zancan DM, Achaval M (2005) Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp Biochem Physiol A* 14: 230-238

- Takeuchi H, Araki Y, Emaduddin M, Zhang W, Han XY, Salunga TL, Wong SM (1996) Identifiable *Achatina* giant neurones: their localizations in ganglia, axonal pathways and pharmacological features. *Gen Pharmacol* 27: 3-32
- Tillier S (1989) Comparative morphology, phylogeny and classification of land snails and slugs (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). *Malacologia* 30: 1-303
- Vehovszky A, Elekes K (1985) Electrophysiological characteristics of peripheral neurons and their synaptic connections in the intestinal nerve of *Helix pomatia* L. *Comp Biochem Physiol A* 82: 345-353
- Walker G (1972) The digestive system of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller): experiments on phagocytosis and nutrient absorption. *Proc Malac Soc Lond* 40: 33-43
- Zaitseva OV (2006) Nerve cells in the digestive tract epithelium of gastropods. *Doklady Biol Sci* 408: 220-222
- Zaitseva OV, Filimonova SA (2006) Nerve cell and nerve plexus ultrastructure in the digestive tract epithelium of gastropoda. *Doklady Biol Sci* 409: 308-310
- Zaitseva OV, Kuznetsovab TV, Markosovaa TG (2009) NADPH diaphorase activity in the digestive system of gastropod molluscs *Achatina fulica* and *Littorina littorea*. *J Evol Biochem Physiol* 45: 125-137
- Zancan DM, Brauer M, Achaval M (1997) Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp Biochem Physiol A* 118: 765-772
- Zhuravlev V, Bugaj V, Kodirov S, Safonova T, Staruschenko A (2001) Giant multimodal heart motoneurons of *Achatina fulica*: a new cardioregulatory input in pulmonates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130: 183-196

Figures legends

Fig. 1. General morphology of the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. Schematic drawing of the digestive tract (dorsal view). The rectum was extended to allow better visualization. Hematoxylin and eosin staining of the gastrointesnal tract wall. **(A)** Horizontal section of the pro-ventricle. **(B)** Horizontal section of the gizzard. **(C)** Horizontal section of the pro-intestine or typhlosolear region with the two typhlosoles. **(D)** Horizontal section of the rectum. **a** anus, **e** esophagus and crop, **f** foot, **gz** gizzard, **h** hepatopancreas (**h1** anterior duct, **h2** posterior duct), **l** lung, **mi** mid-intestine, **n** nerves, **o** ovotestis, **p** penis, **pi** post-intestine, **pv** pro-ventricle, **r** rectum, **rp** renopericardial cavity, **rs** radular sac, **t** typhlosolear intestine, **T** typhlosoles, **1** mucosa, **2** submucosa, **3'** circular muscular layer, **3''** longitudinal muscular layer, **3'''** muscular oblique layer, **4** serosa. Black arrow indicates the antero-posterior axis. Scale bars: 1 cm (scheme), 100µm (**A-D**).

Fig. 2. Central innervation of the gastrointestinal tract and distribution of backfilled neurons in the subesophageal ganglia of *M. abbreviatus*. **(A)** Schematic drawing of the central (extrinsic) innervation indicating the origins of the common visceral nerve and rectum-anal nerve from the visceral ganglion and its ramifications (dorsal view). The branches of the common visceral nerve are shown: reno-pericardial, gastrointestinal and terminal branches. The rectum-anal nerve divides into rectal and anal branches. The stomatogastric nervous system is constituted by the stomatogastric, gastric, cardiac and pyloric ganglia and their respective nerves. **(B)** Schematic representation of the labeled neuronal somata from the gastrointestinal branch which were labeled simultaneously with three different backfilling methods: horseradish peroxidase (HRP), CoCl₂ and biocytin. **(C)** Semi-schematic representation of the ganglionic neurons labeled from the rectum-anal nerve consistently and coincidentally labeled by the three tracing methods. The black circles represent the labeled

neurons backfilled in dorsal, medium and ventral sections, the gray circles represent the labeled neurons located only in the dorsal sections. The white circles represent the labeled neurons located only in medium sections. Photomicrographs of the subesophageal ganglia show the principal clusters of neurons backfilled with CoCl₂ and HRP. **(D)** Gastrointestinal branch labeled neurons by CoCl₂ backfilling in a middle section of the left posterior quadrant of the visceral and left parietal ganglia. **(E)** Middle section of the visceral and right parietal ganglia showing ganglionic neurons backfilled from the rectum-anal nerve with HRP. **(F)** Ganglionic neurons backfilled from the rectum-anal nerve in a dorsal section of the visceral ganglion with CoCl₂. **A** anal branch, **a** aorta, **an** anus, **c** cardiac ganglion, **ca** cephalic artery, **e** esophagus, **g** gastric ganglion, **Gb** gastrointestinal branch, **gz** gizzard, **i** intestine, **LPa** left parietal ganglion, **LPe** left pedal ganglion, **LPI** left pleural ganglion, **p** pyloric ganglion, **pv** pro-ventricle, **R** rectal branch, **r** rectum, **RP** reno-pericardial nerve, **RPa** right parietal ganglion, **RPe** right pedal ganglion, **RPI** right pleural ganglion, **Rn** rectum-anal nerve, **rs** radular sac, **stg** stomatogastric ganglion, **T** terminal branch, **VG** visceral ganglion, **Vn** common visceral nerve. Black-arrow indicates the antero-posterior axis and an asterisk indicates the common nerve trunk of Vn and Rn. Scale bars: 1 cm **(A)**, 400µm **(B-C)**, 120µm **(D-F)**, 100µm **(E)**.

Fig. 3. The stomatogastric nervous system, located in the outer stomach wall of *M. abbreviatus* is constituted by the stomatogastric, gastric, cardiac, and pyloric ganglia. The stomatogastric nerve, pro-ventricular dorsal nerve, pro-ventricular lateral nerves and esophageal superior nerves are also indicated. Longitudinal sections of the stomach wall stained with Heidenhain's hematoxylin (a-d) show the stomatogastric system and the distribution of neuronal somata and nerves. **(A-B)** Stomatogastric ganglion. **(C)** Cardiac ganglion. **(D)** Gastric and pyloric ganglia. **(E-F)** Anterograde labeling with Lucifer Yellow

(LY) from the gastrointestinal branch (Gb) resulted in labeled nerve branches penetrating the serosa of the stomach. Gb nerve fibers ramify below the serosa (inset). (**G-H**) The projections of the stomatogastric nerve, labeled with LY were visualized in the muscular layer and among the enteric nervous elements. **c** Cardiac ganglion, **e** esophagus, **g** gastric ganglion, **gz** gizzard, **i** intestine, **m** mucosa layer, **ml** muscular layer, **p** pyloric ganglion, **pv** pro-ventricle, **s** submucosa layer, **se** serosa, **stg** stomatogastric ganglion, **1** stomatogastric nerve, **2** pro-ventricular dorsal nerve, **3** pro-ventricular lateral nerves, **4** esophageal superior nerves. Black-arrow indicates the antero-posterior axis. White-arrows indicate nerve fibers, arrowheads indicate neuronal somata and asterisk indicates intraepithelial cells. Scale bars: 1 cm (scheme), 200 μ m (**A-D**), 100 μ m (**E-H**), 150 μ m (**F-G**), 50 μ m (inset).

Fig. 4. Micrographs of the digestive tract of *M. abbreviatus* showing the enteric nervous system (ENS) stained with silver nitrate impregnation (**A-B-C-F-G-H-I**) or with methylene blue (**D-E**). Horizontal (**A-B-D-E-F-G-H-I**) and transversal (**C**) sections. (**A**) Topographical view of the myenteric and submucous plexuses in the intestine, showing the scattered network in both plexuses. (**B-C-D**) Unipolar neurons (black arrowheads) predominate in the ENS. (**E**) Small clusters of myenteric and submucous neurons and neurons with blurred contours (“shadows”, white arrowheads) located in different levels of the wall. (**F**) Branches of thick nerve fibers (white-arrows) extend along the entire length of the typhlosoles and in the myenteric plexus of pro-intestine. (**G**) Intraepithelial cells (asterisks) in the mucosa layer. (**H**) Multipolar fusiform cells (black-arrows). (**I**) Bipolar-type fusiform cells scattered in the myenteric plexus. **mn** myenteric neurons, **mp** myenteric plexus, **sn** submucous neurons, **sp** submucous plexus, **T** typhlosole. Scale bars: 100 μ m (**A-B-F**), 50 μ m (**C-E**), 150 μ m (**G**), 10 μ m (**H-I**).

Table Captions

Table 1 Number of backfilled neurons of the CNS that constitutes the Gb in *M. abbreviatus*, consistently and coincidentally labeled by the three staining methods

Table 2 Number of backfilled neurons of the CNS that constitutes the Rn in *M. abbreviatus*, consistently and coincidentally labeled by the three staining methods

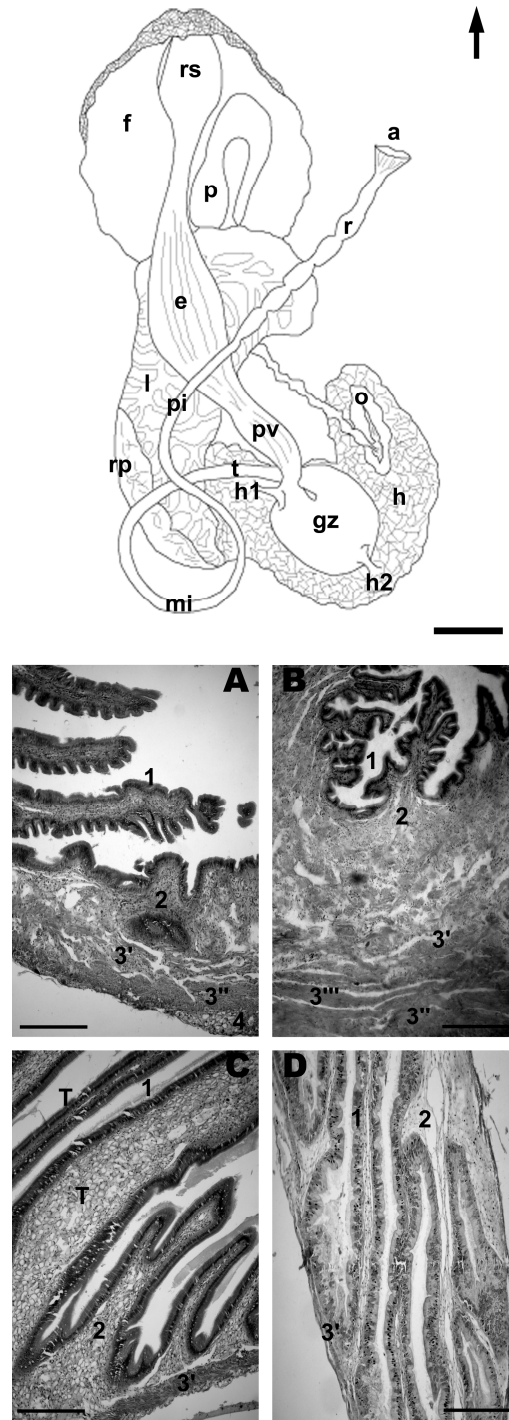


Fig. 1. General morphology of the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. Schematic drawing of the digestive tract (dorsal view). The rectum was extended to allow better visualization. Hematoxylin and eosin staining of the gastrointestnal tract wall. (A) Horizontal section of the pro-ventricle. (B) Horizontal section of the gizzard. (C) Horizontal section of the pro-intestine or typhlosolear region with the two typhlosoles. (D) Horizontal section of the rectum. **a** anus, **e** esophagus and crop, **f** foot, **gz** gizzard, **h** hepatopancreas (**h1** anterior duct, **h2** posterior duct), **l** lung, **mi** mid-intestine, **n** nerves, **o** ovotestis, **p** penis, **pi** post-intestine, **pv** pro-ventricle, **r** rectum, **rp** renopericardial cavity, **rs** radular sac, **t** typhlosolear intestine, **T** typhlosoles, **1** mucosa, **2** submucosa, **3'** circular muscular layer, **3''** longitudinal muscular layer, **3'''** muscular oblique layer, **4** serosa. Black arrow indicates the antero-posterior axis. Scale bars: 1 cm (scheme), 100µm (A-D).

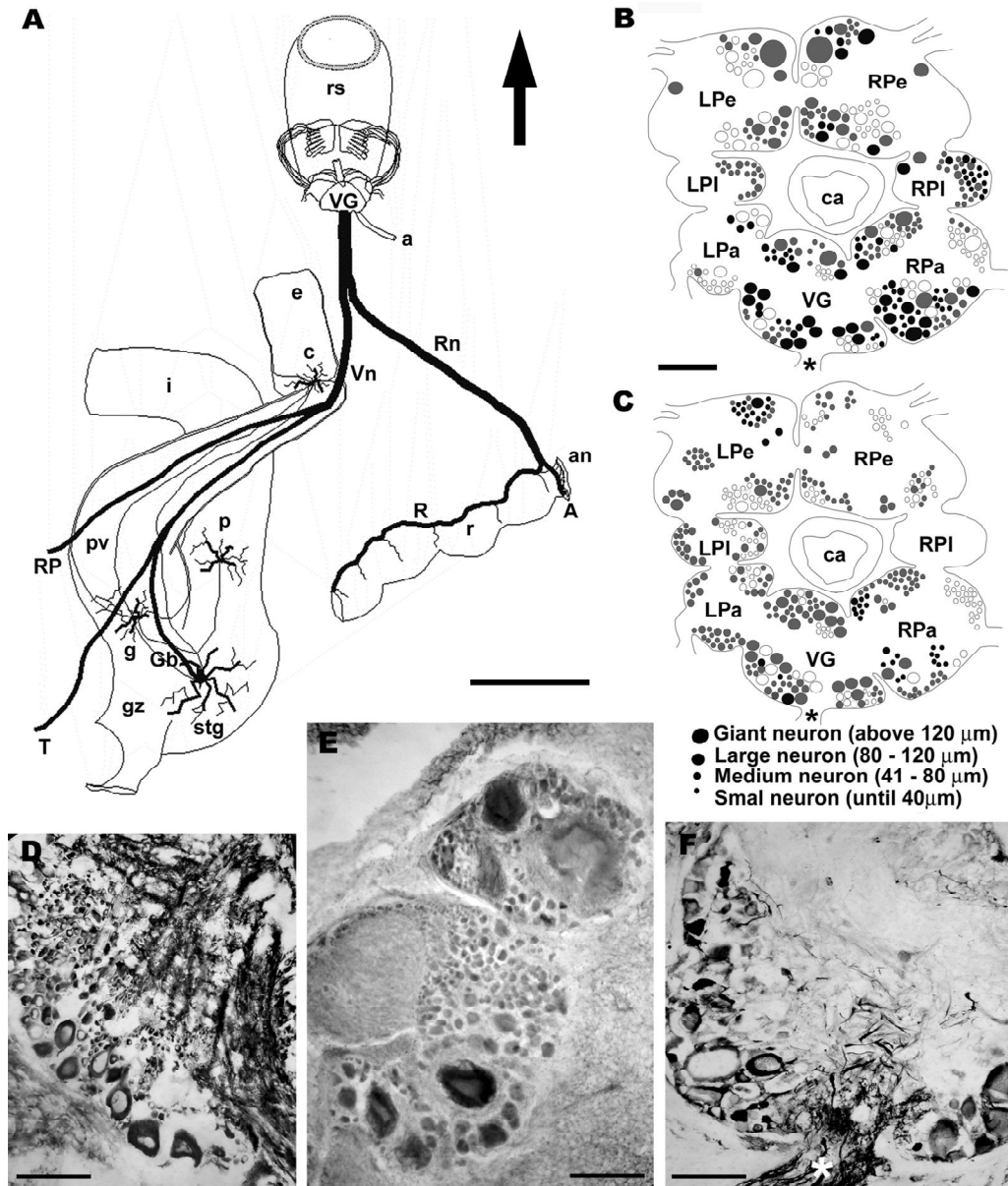


Fig. 2. Central innervation of the gastrointestinal tract and distribution of backfilled neurons in the subesophageal ganglia of *M. abbreviatus*. (A) Schematic drawing of the central (extrinsic) innervation indicating the origins of the common visceral nerve and rectum-anal nerve from the visceral ganglion and its ramifications (dorsal view). The branches of the common visceral nerve are shown: reno-pericardial, gastrointestinal and terminal branches. The rectum-anal nerve divides into rectal and anal branches. The stomatogastric nervous system is constituted by the stomatogastric, gastric, cardiac and pyloric ganglia and their respective nerves. (B) Schematic representation of the labeled neuronal somata from the gastrointestinal branch which were labeled simultaneously with three different backfilling methods: horseradish peroxidase (HRP), CoCl_2 and biocytin. (C) Semi-schematic representation of the ganglionic neurons labeled from the rectum-anal nerve consistently and coincidentally labeled by the three tracing methods. The black circles represent the labeled neurons backfilled in dorsal, medium and ventral sections, the gray circles represent the labeled neurons located only in the dorsal sections. The white circles represent the labeled neurons located only in medium sections. Photomicrographs of the subesophageal ganglia show the principal clusters of neurons backfilled with CoCl_2 and HRP. (D) Gastrointestinal branch labeled neurons by CoCl_2 backfilling in a middle section of the left posterior quadrant of the visceral and left parietal ganglia. (E) Middle section of the visceral and right parietal ganglia showing ganglionic neurons backfilled from the rectum-anal nerve with HRP. (F) Ganglionic neurons backfilled from the rectum-anal nerve in a dorsal section of the visceral ganglion with CoCl_2 . A anal branch, a aorta, an anus, c

cardic ganglion, **ca** cephalic artery, **e** esophagus, **g** gastric ganglion, **Gb** gastrointestinal branch, **gz** gizzard, **i** intestine, **LPa** left parietal ganglion, **LPe** left pedal ganglion, **LPl** left pleural ganglion, **p** pyloric ganglion, **pv** pro-ventricle, **R** rectal branch, **r** rectum, **RP** reno-pericardial nerve, **RPa** right rarietal ganglion, **RPe** right pedal ganglion, **RPl** right pleural ganglion, **Rn** rectum-anal nerve, **rs** radular sac, **stg** stomatogastric ganglion, **T** terminal branch, **VG** visceral ganglion, **Vn** common visceral nerve. Black-arrow indicates the antero-posterior axis and an asterisk indicates the common nerve trunk of Vn and Rn. Scale bars: 1 cm (**A**), 400µm (**B-C**), 120µm (**D-F**), 100µm (**E**).

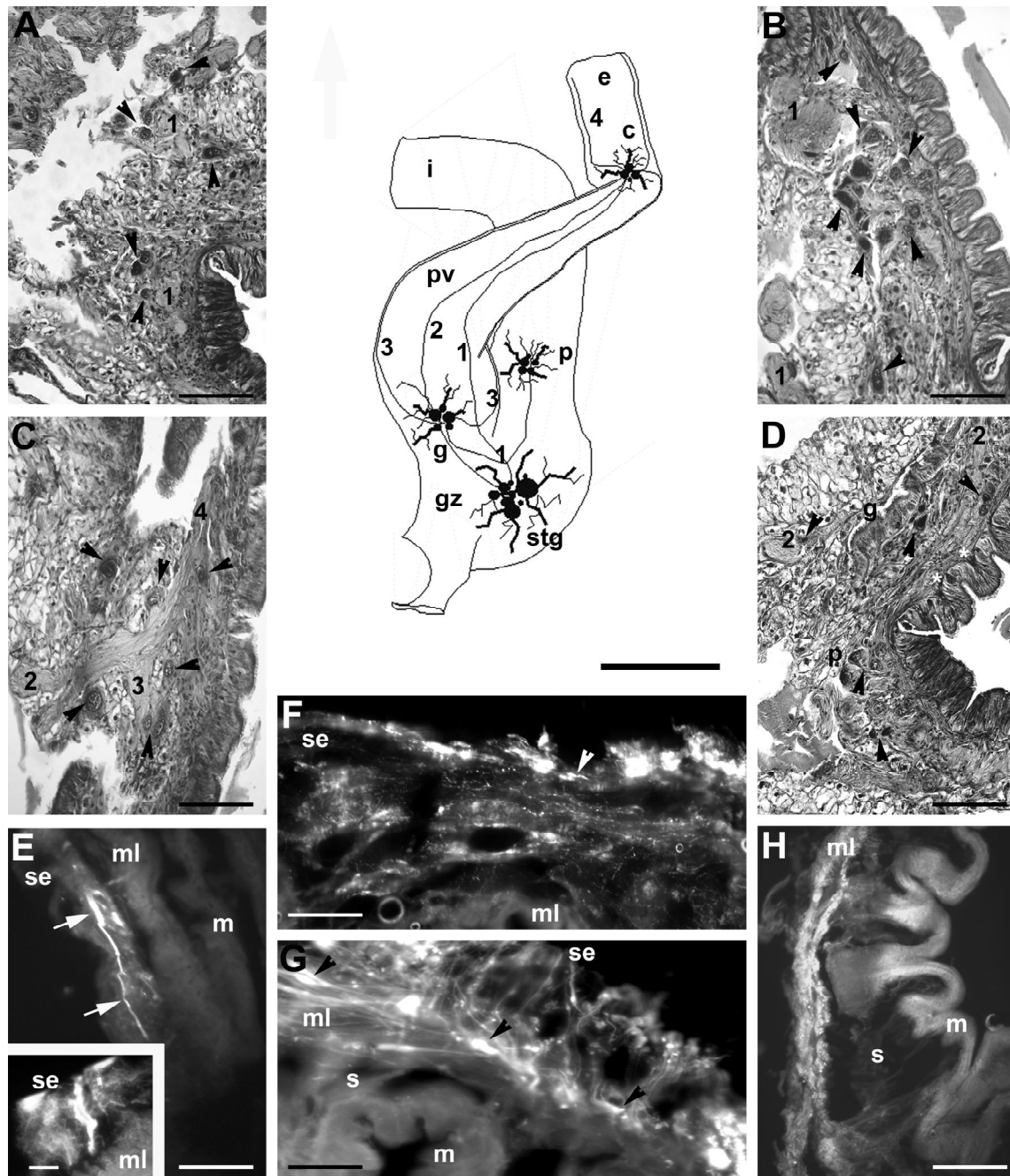


Fig. 3. The stomatogastric nervous system, located in the outer stomach wall of *M. abbreviatus* is constituted by the stomatogastric, gastric, cardiac, and pyloric ganglia. The stomatogastric nerve, pro-ventricular dorsal nerve, pro-ventricular lateral nerves and esophageal superior nerves are also indicated. Longitudinal sections of the stomach wall stained with Heidenhain's hematoxylin (a-d) show the stomatogastric system and the distribution of neuronal somata and nerves. (A-B) Stomatogastric ganglion. (C) Cardiac ganglion. (D) Gastric and pyloric ganglia. (E-F) Anterograde labeling with Lucifer Yellow (LY) from the gastrointestinal branch (Gb) resulted in labeled nerve branches penetrating the serosa of the stomach. Gb nerve fibers ramify below the serosa (inset). (G-H) The projections of the stomatogastric nerve, labeled with LY were visualized in the muscular layer and among the enteric nervous elements. c Cardic ganglion, e esophagus, g gastric ganglion, gz gizzard, i intestine, m mucosa layer, ml muscular layer, p pyloric ganglion, pv pro-ventricle, s submucosa layer, se serosa, stg stomatogastric ganglion, 1 stomatogastric nerve, 2 pro-ventricular dorsal nerve, 3 pro-ventricular lateral nerves, 4 esophageal superior nerves. Black-arrow indicates the antero-posterior axis. White-arrows indicate nerve

fibers, arrowheads indicate neuronal somata and asterisk indicates intraepithelial cells. Scale bars: 1 cm (scheme), 200 μ m (**A-D**), 100 μ m (**E-H**), 150 μ m (**F-G**), 50 μ m (inset).

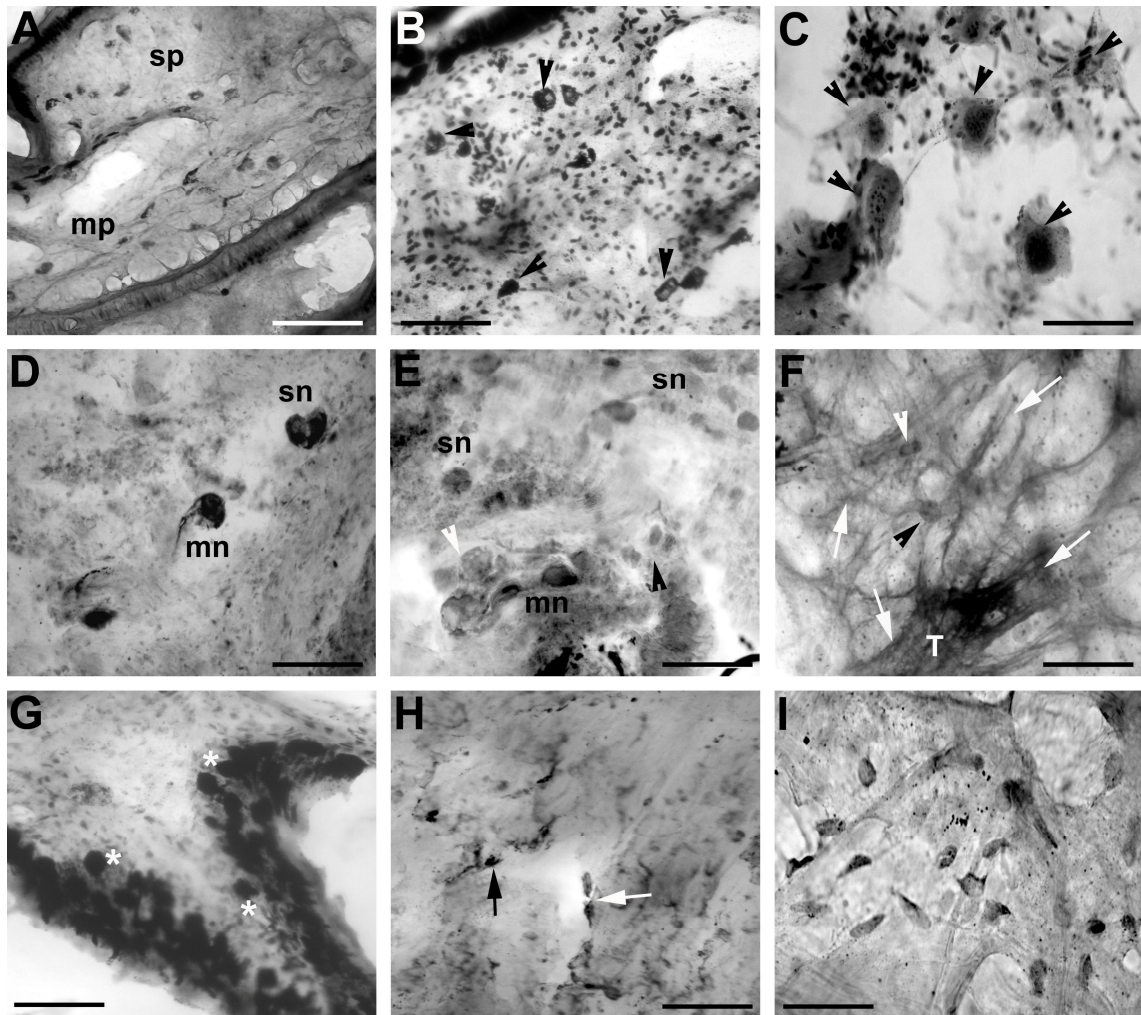


Fig. 4. Micrographs of the digestive tract of *M. abbreviatus* showing the enteric nervous system (ENS) stained with silver nitrate impregnation (A-B-C-F-G-H-I) or with methylene blue (D-E). Horizontal (A-B-D-E-F-G-H-I) and transversal (C) sections. (A) Topographical view of the myenteric and submucous plexuses in the intestine, showing the scattered network in both plexuses. (B-C-D) Unipolar neurons (black arrowheads) predominate in the ENS. (E) Small clusters of myenteric and submucous neurons and neurons with blurred contours (“shadows”, white arrowheads) located in different levels of the wall. (F) Branches of thick nerve fibers (white-arrows) extend along the entire length of the typhlosoles and in the myenteric plexus of pro-intestine. (G) Intraepithelial cells (asterisks) in the mucosa layer. (H) Multipolar fusiform cells (black-arrows). (I) Bipolar-type fusiform cells scattered in the myenteric plexus. **mn** myenteric neurons, **mp** myenteric plexus, **sn** submucous neurons, **sp** submucous plexus, **T** typhlosole. Scale bars: 100 μ m (A-B-F), 50 μ m (C-E), 150 μ m (G), 10 μ m (H-I).

Table 1 Number of backfilled neurons of the CNS that constitutes the Gb in *M. abbreviatus*, consistently and coincidentally labeled by the three staining methods

Location of the cell bodies	Cellular diameter (μm)				Total number of cell bodies per ganglion	% total cell bodies per ganglion	
	10 – 40	41 – 80	81 – 120	> 120			
VG	D	10	5	3	-	61	26.4
	M	8	4	2	-		
	V	11	6	12	-		
RPa	D	24	3	2	2	96	29.4
	M	19	11	3	1		
	V	15	9	6	1		
LPa	D	-	1	-	-	21	6.6
	M	11	3	3	-		
	V	-	3	-	-		
RPI	D	15	3	1	-	35	12.4
	M	-	-	-	-		
	V	13	2	1	-		
LPI	D	16	2	-	-	18	5.7
	M	-	-	-	-		
	V	-	-	-	-		
RPe	D	12	5	6	1	54	18.6
	M	8	8	5	1		
	V	-	4	4	-		
LPe	D	6	7	6	1	37	11.5
	M	5	7	4	1		
	V	-	-	-	-		
Total (all ganglia)					322	100	

VG Visceral ganglion; **RPa** Right parietal ganglion; **LPa** Left parietal ganglion; **RPI** Right pleural ganglion; **LPI** Left pleural ganglion; **RPe** Right pedal ganglion; **LPe** Left pedal ganglion; **D** Dorsal section; **M** Medium section; **V** Ventral section

Table 2 Number of backfilled neurons of the CNS that constitutes the Rn in *M. abbreviatus*, consistently and coincidentally labeled by the three staining methods

Location of the cell bodies	Cellular diameter (μm)				Total number per ganglion	% cell bodies per ganglion	
	10 – 40	41 – 80	81 – 120	> 120			
VG	D	25	16	15	-	82	21.18
	M	10	7	5	-		
	V	2	1	1	-		
RPa	D	33	4	2	-	85	21.96
	M	21	2	1	-		
	V	20	2	-	-		
LPa	D	19	14	-	-	40	10.35
	M	3	4	-	-		
	V	-	-	-	-		
LPI	D	13	8	-	-	35	9.04
	M	13	1	-	-		
	V	-	-	-	-		
RPe	D	30	8	-	-	68	17.57
	M	25	5	-	-		
	V	-	-	-	-		
LPe	D	37	4	2	-	77	19.9
	M	15	2	1	-		
	V	13	2	1	-		
Total (all ganglia)					387	100	

VG Visceral ganglion; **RPa** Right parietal ganglion; **LPa** Left parietal ganglion; **LPI** Left pleural ganglion; **RPe** Right pedal ganglion; **LPe** Left pedal ganglion; **D** Dorsal section; **M** Medium section; **V** Ventral section

ARTIGO II: Chemical coding characterization of the stomatogastric and enteric nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus*

OBJETIVO ESPECÍFICO

Tendo em vista os resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho, onde foi possível descrever a inervação extrínseca (representada pelo SNC e a descoberta da presença do SNEG) e a inervação intrínseca (constituída pelo SNE) tornou-se pertinente uma investigação sobre o código químico dos neurônios envolvidos neste processo. Para tanto, foram caracterizados os tipos neuronais do SNEG e dos plexos intramurais por meio da detecção da atividade das enzimas dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase (NADPH-d) e acetilcolinesterase (AChE), do método histoquímico do ácido glioxílico (AG) para detecção de monoaminas e da imunorreatividade ao peptídeo relacionado à FMRFamida (FMRFa-ir) e serotonina (5HT-ir). Por fim, para investigar as células gliais foi realizada a imunohistoquímica para a proteína fibrilar ácida glial (GFAP-ir) no SNEG e no SNE.

METODOLOGIA

Nesta etapa, foi investigado o código químico dos neurônios estomatogástricos e entéricos no estômago, intestino e reto do caracol *M. abbreviatus*. Para tanto foram utilizados 18 animais em três momentos distintos: (1) 6 animais tiveram retirados o estômago, intestino e reto, que foram fixados em paraformaldeído 4%, diluído em TF por 4h a 4°C, crioprotetidos em sacarose 15% e 30%, diluídas em TF. Logo após foram embebidos em meio especial para congelamento (Tissue-tek, Leika) e seccionados em criostato (Micron HM 505E, -18°C, 50 µm), coletados em lâminas gelatinizadas ou em frascos contendo PBS (*free-floating*) e submetidos às técnicas de AChE (lâminas) ou NADPH-d e imunohistoquímica (*free-floating*); (2) outros 6 animais após dissecados o estômago, intestino e reto foram congelados em meio de congelamento (Tissue-tek), diretamente seccionados em criostato (Micron HM 505E, -20°C, 50 µm) e submetidos ao método do AG; (3) enquanto que outros 6 animais tiveram retirados o intestino e o reto, que depois de fixados em paraformaldeído 4%, diluído em TF por 4h a 4°C, foram submetidos ao método da NADPH-d para posterior confecção de preparados de membrana.

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA ATIVIDADE DA AChE: Dos métodos histoquímicos existentes para a detecção da atividade acetilcolinesterásica, optou-se pelo método de Karnovsky & Roots (1964). Por este método, a AChE pode ser demonstrada, incubando o tecido em um meio contendo o substrato acetiltiocolina, ferricianeto e íons de cobre quelados com citrato. O grupo sulfidril da tiocolina formada reduz os íons de ferricianeto, que precipitam como um sal de cobre, o ferricianeto cúprico, de coloração marrom avermelhada. Para a localização da atividade da enzima AChE, as lâminas contendo os cortes foram lavadas em tampão TM 0,1M pH 6,0 para remoção do meio de embebição e, depois, colocadas no meio de incubação contendo: iodeto de acetiltiocolina (2,1 mM, Sigma), citrato de sódio 0,1M, sulfato cúprico 30 mM, ferricianeto de potássio 5 mM e água deionizada em tampão TM, a temperatura ambiente por 12h, protegidas da luz para que ocorresse a reação de hidrólise do iodeto de acetiltiocolina, catalisado pela AChE tecidual. Realizou-se o controle da especificidade da reação com a omissão do substrato (acetiltiocolina) no meio de incubação. Alguns cortes foram tratados com o inibidor de colinesterase, sulfato de eserina (sulfato de fisostigmina, 10^{-4} M, Sigma), por 30 min a 37°C, antes da incubação. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em TM, desidratadas, diafanizadas em xilol e montadas com bálsamo e laminulas. Os resultados obtidos foram observados em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

ANÁLISE HISTOQUÍMICA DA ATIVIDADE DA NADPH-d: Esta técnica permitiu identificar populações neuronais com esta atividade enzimática que indiretamente permite localizar a enzima NOS. A enzima citossólica NADPH-d foi utilizada como substrato em reação com o azul de nitrotetrazólio (*nitro blue tetrazolium*, NBT), resultando em um precipitado azul escuro insolúvel, o formazam, obtido pela liberação de elétrons do NADPH. O protocolo utilizado foi adaptado de WEINBERG *et al* (1996), onde os cortes *free-floating* ou o intestino e reto foram lavados duas vezes em PBS por 30 min, visando retirar o excesso do meio de embebição. Logo após, foram incubados em meio contendo: Triton X-100 (Sigma) 0,2% em solução de PBS 0,1M, pH 7,4 acrescido de 0,5 mg de NBT (Sigma) e 0,1 mg de β -NADPH (Sigma) para cada mililitro da solução, por 24 h à 37°C, sendo novamente lavados por duas vezes de 30 min em PBS. A seguir, os cortes foram aderidos a lâminas bi-gelatinizadas e montados com Aquatex (Merck) e laminulas. O intestino e o reto foram confeccionados os preparados de membrana, que posteriormente foram aderidos às lâminas e montados com

Aquatex e lamínulas. O controle da especificidade da reação foi realizado com a omissão do substrato (β -NADPH) no meio de incubação. Os resultados obtidos foram observados em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

HISTOFLUORESCÊNCIA PELO MÉTODO DO AG: Este método histoquímico (De La Torre e Surgeon, 1976 modificado por Zancan *et al.*, 1997) buscou revelar a presença de monoaminas por histofluorescência no SNEG, estômago, intestino e reto de *M. abbreviatus*. O AG (HOOC-CHO) foi utilizado por apresentar uma grande capacidade de formação de fluoróforos com catecolaminas, indolaminas e compostos estruturalmente relacionados (LINDVALL *et al.*, 1973). A fluorescência resulta da catálise ácida intramolecular exercida pelo grupo carboxila do AG sobre o carbono-1 do produto primário da reação (1,2,3,4-tetrahidro- β -carbonila-1-ácido carboxílico). A fluorescência das catecolaminas pode ser observada sob luz ultravioleta. Para a detecção de monoaminas por meio do AG, os cortes previamente coletados em lâminas foram secados à temperatura ambiente e tratados com solução de incubação constituída de 3,4 g de sacarose, 1,6 g de fosfato de potássio monobásico e 2 g de AG (Sigma) durante 5 min. Após secados sob jato de ar frio, as lâminas foram colocadas a 80°C durante 4 min, para a formação dos fluoróforos com as monoaminas. As lâminas foram montadas com óleo mineral (Sigma) e lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência (Olympus FV 1000), com filtro de excitação 380-425nm e de barreira 450nm. Sob esse sistema de filtros, foi observada a fluorescência azul para catecolaminas e amarelo-esverdeado para serotonina. O controle da especificidade da reação foi realizado com a omissão do AG no meio de incubação. Os resultados obtidos foram fotodocumentados.

PROCEDIMENTO DE IMUNOHISTOQUÍMICA: O princípio da técnica consiste na reação antígeno-anticorpo formada *in locus* nas secções do tecido. Os cortes *free-floating* coletados em PBS, são em seguida, submetidos ao procedimento de imunohistoquímica para o peptídeo relacionado ao FMRF-amida, 5HT e GFAP. Para a demonstração da imunorreatividade a estas substâncias foi utilizada a técnica do anticorpo não marcado de Sternberger (1979). Inicialmente, os cortes receberam um pré-tratamento com uma solução de metanol 10% diluída em solução de peróxido de hidrogênio 3% em PBS, seguida de incubação com soro normal de cabra 3% em Triton X-100 0,4% (Sigma) diluído em PBS (PBS-

T) na concentração de 1:50, durante 30 minutos, para bloqueio da atividade da peroxidase endógena e sítios inespecíficos de união dos anticorpos antes da incubação com o anticorpo primário. Em seguida, foi iniciada a incubação com o anticorpo primário anti-FMRF-amida (1:1200, Chemicon), policlonal de coelho desenvolvido em cabra, anti-serotonina (1:500, Sigma), policlonal de coelho desenvolvido em cabra e anti-GFAP (1:50, Sigma), policlonal de camundongo produzido em coelho diluídos em PBS-T. As incubações foram de 48 h a 4°C sob agitação constante. Após lavagem em PBS-T, os cortes foram incubados com o anticorpo IgG anti-coelho desenvolvido em cabra (Sigma) na concentração de 1:100 em PBS-T durante 60 min à temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS-T, os cortes foram incubados com o complexo PAP (peroxidase-antiperoxidase) (Sigma) 1:500 em PBS-T, durante 90 minutos. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, o qual, por sua vez, reconhece o anticorpo primário. A peroxidase foi revelada pelo método histoquímico de Graham & Karnovsky (1966), que consiste na combinação com o substrato, o H_2O_2 , formando um complexo HRP- H_2O_2 , que pode oxidar diferentes cromógenos, resultando em um precipitado corado. Assim, para a revelação da reação imunoistoquímica os cortes foram incubados em uma solução de DAB (Sigma) 0,06% em PBS e em uma solução de H_2O_2 10% em água deionizada. Para isso, os cortes foram incubados por 10 minutos na solução de DAB, sendo acrescentada, logo em seguida, a solução de H_2O_2 0,005%, permanecendo neste meio por 10 minutos para o aparecimento de um precipitado de cor parda. Depois da revelação, os cortes foram lavados em PBS, coletados em lâminas gelatinizadas, desidratados em etanol, diafanizados com xilol e montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas. Para a determinação da especificidade da imunorreação, alguns cortes foram incubados sem o anticorpo primário e nenhuma reação imunoistoquímica foi observada. Os resultados obtidos foram observados em microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) e fotodocumentados (câmera digital Sony Cybershot DSC-N2).

RESULTADOS

Chemical coding characterization of the stomatogastric and enteric nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus*

A ser submetido para Zoomorphology.

**Chemical coding characterization of the stomatogastric and enteric nervous system of
the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus***

**Malcon Andrei Martinez-Pereira^{1,2}; Raphaela da Cunha Franceschi^{1,2}; Bárbara
Paranhos Coelho²; Denise M. Zancan^{1,2*}**

¹Neuroscience Graduate Program, Institute of Basic Health Sciences (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

²Laboratory of Comparative Neurobiology, Department of Physiology, ICBS, UFRGS, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

***Corresponding author**

Telephone: +55-51-33083305. Fax: +55-51-33083155. E-mail: zancan@ufrgs.br

Number of text pages of the whole manuscript (including figures and tables): 42

Number of figures: 6

Abstract The snail *Megalobulimus abbreviatus* is used to analyze the role of the nervous system in the midgut and hindgut. The chemical coding of the stomatogastric nervous system (STNS) and enteric nervous system (ENS) of the midgut and hindgut of this species is investigated using histochemical analysis of the acetylcholinesterase (AChE) and nicotinamide adenine dinucleotide diaphorase (NADPHd) activities, as well as glyoxylic acid (GA) for monoamine detection, and immunohistochemical techniques for detecting serotonin (5HT-ir), FMRFamide (FMRFa-ir) and glial fibrillary acidic protein (GFAP-ir). The plexus in the midgut and hindgut is constituted of fibers originating from the STNS or the subesophageal complex through peripheral nerves, showed intense AChE and NADPHd activity. The enteric neurons and fibers with AChE activity are scattered in the submucosa and between the circular and longitudinal muscle layers of the stomach, intestine and rectum, whereas neuronal bodies and fibers showing NADPHd activity are more abundant throughout the mass of muscle fibers than in the submucosal layer. Catecholaminergic nerve fibers and varicosities revealed by the GA method are found throughout the mid and hindgut. 5HTir neurons and fibers, originating from the STNS are distributed in the submucosal layer of the intestine and rectum. Neuronal cell bodies and fibers with FMRFa-ir elements are present in the mucosal, submucosal and muscular layers throughout the mid and hindgut. The neuron-like intraepithelial cells showed AChE activity and 5HT and FMRFa-ir and very little NADPHd activity. Labeled processes are organized in a subepithelial plexus. Intense GFAP-ir is found throughout the mid and hindgut plexuses and in the ganglia of the STNS. This intense immunoreaction to GFAP in intramural plexuses suggests glial cells have an important role in the peripheral nervous system of the digestive tract in this pulmonate snail.

Keywords: enteric nervous system, stomatogastric nervous system, serotonin, FMRFamide, GFAP, pulmonate snail

Introduction

The gastrointestinal tract (GI) in molluscs is innervated by the central nervous system (CNS) and by an enteric nervous system (ENS). The subesophageal complex, through the visceral ganglion, and the buccal ganglia constitute the central elements of digestive nervous control (Bullock and Horridge 1965; Chase 2002). In some invertebrates an intermediate integration level is described between the CNS and ENS. In annelids and arthropods, the rhythmic activity of the GI is coordinated by the stomatogastric nervous system (STNS), which belongs to the peripheral nervous system (Swensen et al. 2000; Skiebe 2001; Barná et al. 2001, Ierusalimsky and Balaban 2006) and is supplied by extrinsic fibers from the CNS (Katz 2007).

In gastropods the nomenclature STNS was initially attributed to the buccal ganglia that innervate the GI through the esophageal nerves (Bullock and Horridge 1965). This neural system in gastropods is more described in the opisthobranch *Aplysia* and is considered as a component of the ENS (Fujisawa et al. 1999; Furukawa et al. 2001; Morishita et al. 2003; Ito and Kurokawa, 2002; 2007). Nevertheless, in *Megalobulimus abbreviatus* the STNS is an extension of the peripheral nervous system that includes four ganglia (stomatogastric, cardiac, gastric, pyloric) on the wall of the stomach, the largest ganglion of which, the stomatogastric, is innervated by the gastrointestinal branch from the subesophageal complex (Martinez-Pereira et al. 2012, *in press*). Thus, in the *M. abbreviatus* are observed two levels of control in the GI: extrinsic (represented by the subesophageal ganglia and STNS) and intrinsic (the ENS). However, these data reflect only the general morphology of the STNS, being necessary to investigate the chemistry neuroanatomy of the system in gastropods.

The ENS has been shown to be important for regulating and coordinating the movements of the digestive tract. It has proposed that the ENS in gastropods consists of two main components: submucosal (SP) and myenteric plexuses (MP). The myenteric network contains

several unipolar ganglion cells and bipolar internuncial neurons, and innervates the circular and longitudinal muscle layers of the whole alimentary canal (Bullock and Horridge 1965). The submucosal plexus innervates the haemocelic spaces, epithelial cells and mucosal neurons (Alba et al. 1988). However, other elements have been described, such as the neuron-like intraepithelial cells and enteric glial cells.

The neuron-like intraepithelial cells differ in their morphology and neurochemistry and are present in the mucosa of various gastropods (Zaitseva and Filimonova 2006; Zaitseva and Markosova 2008; Zaitseva et al. 2009). In lower vertebrates, such as fish, and some invertebrates (Annelida, Echinodermata, Eulamellibranchia, Priapulida and Brachiopoda), these cells have also been detected (Punin 2001; Punin and Zaitseva 2002). Enteroglia is a component of the ENS which should receive more attention in invertebrates. In the vertebrates, recent evidence indicates that enteric glia, which vastly outnumber enteric neurons, are actively involved in several levels of control of GI functions, such as in the machinery for uptake and degradation of neuroligands, and express neurotransmitter receptors which make them well suited as intermediates in enteric neurotransmission and information processing in the ENS (Rühl 2005; Bassotti et al. 2007ab; Silveira et al. 2007). Despite the similarities between the neural elements of the ENS in vertebrates and invertebrates, no evidence has been found of the existence of enteroglia in the molluscs. We are not aware of any studies that investigate glial cells in ENS of invertebrate animals in general.

The chemical coding of the ENS in molluscs (Elekes et al. 1994, Hernádi et al. 1998, Ito and Kurokawa 2007; Kurokawa et al. 2008; Okamoto and Kurokawa 2010, Marchand and Colard 1991; Rószér et al. 2004; 2005; Serfözö et al. 2008), and of the STNS in arthropods (Christie et al. 2004; Klemm et al. 1986; Skiebe 2003) and annelids (Barná et al. 2001; Ierusalimsky and Balaban 2006) has widely been investigated. Yet, the chemical coding of the ENS in gastropods varies greatly between the different groups (S-Rózsa 1984; Hernádi et al. 1998;

Kurokawa et al. 2008) and have limited information on the chemical coding of the STNS in gastropods was observed in some species of *Aplysia* (Fujisawa et al. 1999; Furukawa et al. 2001; Morishita et al. 2003; Ito and Kurokawa 2002; 2007).

In order to understand better the possible role of different signal molecules in feeding and regulation of the alimentary tract, we have studied in details chemical coding characterization and organization of the ENS and STNS in the snail *M. abbreviatus*, paying special attention to the distribution and projections patterns of neurochemically distinct nervous elements and the effects of some signal molecules on the motility of the midgut and hind gut. For this we use (i) serotonin (5HT) and FMRFamide immunostaining, (ii) a histochemical approach to evidence the acetylcholinesterase (AChE) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPHd) activities, (iii) histofluorescent demonstration of monoamines by the glyoxylic acid method (GA) and (iv) immunohistochemistry of fibrillary acidic protein (GFAP) of the midgut and the hindgut, to verify the possible existence of glia in the enteric plexuses of an invertebrate. Such investigations may also be of interest, first from a comparative point of view to see whether the STG in different invertebrate species represent similar organization patterns, and second our present findings may serve as a basis to further studying the role of the different signalling systems in the regulation of the STNS as well as GI control in gastropods.

Materials and methods

Animals: Adult land snails *M. abbreviatus* (Becquaert 1948), (MNRJ 13283) previously cited incorrectly as *Megalobulimus oblongus* or *Strophocheilus oblongus*, were collected in Charqueadas county (29°57'17''S - 51°37'31''W), Rio Grande do Sul, Brazil. Animals with shells measuring 3.6 ± 0.48 cm wide (mean \pm standard error) and 7.12 ± 0.74 cm long and weighing 51.48 ± 1.67 g were used. The animals were kept in terraria for two weeks, under

standard conditions (22 - 26°C; 12 h / 12 h light: dark cycle and fed vegetable and water *ad libitum*). The snails were anesthetized by immersion in a menthol-saturated solution, diluted in physiological solution for the species (Jaeger 1962) for 40 min. All animal procedures were in accordance with the Brazilian law (Federal Law n° 11.794/2008) on procedures for the scientific use of animals.

Experimental procedures

Tissue sections

The GI containing the stomach, intestine and rectum was isolated, washed in physiological solution and used in different procedures to analyze the ENS and STNS chemical coding. (1) The GI (n = 6) were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4 (4h at room temperature), cryoprotected in 15 and 30% sucrose at 4°C before proceeding to embed them in Tissue-Tek (Sakura Finetek, Torrance, CA) and horizontally or transversally sectioned in a cryostat (50 µm, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Germany). After, the sections were used for histochemistry of AChE or NADPHd activities and immunohistochemistry for FMRFamide or 5HT or GFAP. (2) GI were rapidly dissected, embed in Tissue-Tek, frozen and horizontally or transversally sectioned in a cryostat (80µm, Micron HM 505E), transferred to gelatinized slides and submitted to histofluorescent demonstration of monoamines (n = 6). (3) Whole mount preparations of intestine and rectum were confectioned before fixation in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB, pH 7.4 (4h at room temperature) and submitted to NADPHd histochemistry (n = 6).

AChE histochemistry

Karnovsky and Roots method (Karnovsky and Roots 1964) was utilized to detect the AChE activity. The sections (50 µm; cryostat, as described above) were recovered on gelatin-coated

slides, washed in 0.1 M Tris-maleate buffer, pH 6.0 (TM) and then placed in incubation medium containing 2.1 mM acetylthiocholine iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 0.1 M sodium citrate, 30 mM cupric sulfate and 5 mM potassium ferricyanide in buffer TM (12 h at room temperature) protected from light. After incubation the slides were washed in TM, dehydrated in ethanol graded series (70 % to absolute), clarified with xylene and coverslipped with Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For control, the acetylthiocholine iodide was omitted of the same procedure. Prior to incubation, some segments were treated with the cholinesterase inhibitor, eserine sulfate (10^{-4} M physostigmine sulphate, Sigma), for 30 min at 37°C.

NADPHd histochemistry

The NADPHd activity was observed in free-floating sections (for stomach) or whole mounts preparations (for intestine and rectum). The tissues were washed in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, and incubated in the NADPHd solution (0.5 mg/ ml nitro blue tetrazolium (Sigma, St. Louis, MO) in 0.2 % Triton X-100 in PBS + 0.1 mg/ ml β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (β -NADPH, reduced form, Sigma, St. Louis, MO) for 24h at 37°C. After, each intestinal and rectal segment was microdissected in a surgical microscope (DF Vasconcellos, São Paulo, Brazil) to obtain whole mounts preparations of the submucosa and muscular layers. The whole mounts were transferred to gelatinized slides and mounted in Aquatex (Merck, Darmstadt, Germany), while the free-floating sections were recovered on gelatin-coated slides, dehydrated in ethanol graded series (70 % to absolute), clarified with xylene and mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). For control, the β -NADPH was omitted from the reaction solution.

Fluorescence histochemistry

The sucrose phosphate glyoxylic acid (SPG) method for the histofluorescent demonstration of monoamines (De La Torre and Surgeon 1976, modified by Zancan et al. 1997) was applied to thin sections of the GI, as previously described. The gelatinized slides containing the sections were incubated in GA reaction solution (2% glyoxylic acid (GA, Sigma, St. Louis, MO), 0.2 M sucrose in 0.236 M KH_2PO_4 buffer, pH 7.4) for 5 min. Excess solution was removed, and the slides were dried in cool air for 10 min, coverslipped with glycerin and oven-heated for 5 min at 80°C. The reaction was observed in a fluorescence microscope (Olympus FV 1000, Olympus America Inc, Melville, NY) with 380 – 425 nm excitation filter and 450 nm barrier filter, providing a blue fluorescence from catecholamine fluorophores and a yellow fluorescence from indolamine reaction products. As control, in some experiments the GA was omitted from the reaction solution.

Immunohistochemistry

The peroxidase-antiperoxidase (PAP) procedure (Sternberger 1979) was carried out with free-floating sections (50 μm). Briefly, sections were soaked in a solution containing 0.3 % H_2O_2 in 10 % methanol solution in distilled water for 30 min, washed in PBS and incubated with non-immune goat serum 1 : 50 in PBS with 4 % Triton X-100 (PBS-Tx) for 30 min. Then, they were placed in a specific antiserum raised in rabbit against FMRFamide (1:1000, ImmunoStar Inc, Hudson, WI), 5HT (1:500, Sigma, St. Louis, MO) and GFAP (1:50, Sigma, St. Louis, MO) diluted in PBS-Tx, for 48h at 4°C. After this, the sections were washed in PBS-Tx and incubated with anti-rabbit IgG serum (Sigma, St. Louis, MO) diluted 1:50 in PBS-Tx (2h at room temperature). The sections were again washed in PBS-Tx and then incubated in a PAP complex (Sigma, St. Louis, MO) diluted 1:500 in PBS-Tx (2h at room temperature). To locate peroxidase activity, the sections were pre-incubated for 10 min in

0.06% 3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride (Sigma, St. Louis, MO) dissolved in PBS, and then incubated for 10 min in the same solution containing 0.01 % H₂O₂ at room temperature. The sections were washed in PBS, transferred to gelatinized slides, dehydrated in ascending graded ethanol (70 % to absolute), cleared with xylene and mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). For control sections the primary antibody was omitted from the incubation medium.

All the histological results were analyzed and photographed with a Nikon Optiphot-2 microscope. The labeled neurons were located and classified according the following size ranges: small (10.1 – 15 µm), medium (15.1 – 20 µm) and large neurons (20.1 – 50 µm).

Results

Structure and innervation of the GI

The anatomy of the GI of *M. abbreviatus* was previously described (Martinez-Pereira et al. 2012, *in press*). The GI of this species consists of the following portions: buccal mass, esophagus with crop, stomach (pro-ventricle and gizzard), intestine (pro, mid and post-intestine), rectum and anus. The GI wall consists of a mucosa (simple columnar epithelium and lamina propria), submucosa (loose connective tissue with a system of haemocoelic spaces), muscular (circular and longitudinal, while in the gizzard there is an oblique layer) and serosa layers. The midgut (stomach and intestine) receives extrinsic innervation of the CNS, through the gastrointestinal branch (Gb) of the common visceral nerve (Vn) and stomatogastric nervous system (STNS), while the hindgut receives only extrinsic innervation from the CNS, through rectum-anal nerve (Rn). Neurons of pedal, visceral and parietal ganglia participate directly in the innervation of these structures. The STNS is constituted of 25 to 31 neurons distributed in four neuronal ganglia located in the cardia, pro-ventricle, gizzard and pylorus, and respectively denominated stomatogastric, gastric, pyloric and cardiac

ganglia. The GIIt contains an intrinsic innervation represented by the submucous and myenteric plexuses, neuron-like intraepithelial cells and fusiform cells in its entire length, which together make up the ENS.

AChE histochemistry (Figure 1)

In the mid and hindgut, There is a very rich plexus with AChE activity, constituted of nervous fibers originating from either the STNS or the subesophageal complex through peripheral nerves (Gb of the Vn and Rn, respectively). The stomatogastric ganglion (stg) contains six or seven neurons with AChE activity (30 – 100 μm) whose axonal processes run to the other ganglia and to the wall of *Megalobulimus* GIIt. Three AChE positive neurons (20 – 40 μm) are identified in the gastric, pyloric and cardiac ganglia. The nerve fibers from Vn, Rn and Stg showing intense AChE activity spread in the serosa and muscular layers and nerve terminals are also notable in the subepithelial plexus. The varicosities of axonal fibers with intense AChE reaction are more widespread in the intraepithelial and subepithelial plexus and in the most external muscular layer of the wall of the *Megalobulimus* GIIt, subjacent to the serosa. AChE activity is found in many open and closed-type, neuron-like intraepithelial cells along the *Megalobulimus* GIIt. The open-type AChE positive intraepithelial cells are cylindrical in shape and not uniformly located in different regions of the *Megalobulimus* GIIt. The closed-type cells are not exposed to the tract lumen and are located mostly in the basal half of the epithelial layer. These cells are round or elongated in shape, along the epithelium and most of them have several basal processes differing in length. The AChE-positive intraepithelial cells appear individually throughout the epithelium in the gizzard region, but in the pro-ventricle and intestine regions these labeled cells appear in groups. The basal processes of the AChE-positive intraepithelial cells are shown to form the intraepithelial plexus and to project to the subepithelial layer, extending longitudinally along the lamina

propria. AChE activity is also detected along the tract in neurons and nerve fibers scattered in the submucosa and between the circular and longitudinal muscle layers in the stomach, intestine and rectum and constitute the ENS and AChE-positive neurons are distributed in the SP and MP. These neurons are predominantly single small and unipolar, though a few small and medium multipolar and bipolar AChE-positive neurons are also observed. Some regions of the ENS show groups of 3-5 small neurons with AChE activity, which constitute microganglia, immediately under the epithelium or less often in the submucosa and in the muscular layers. The pro-ventricle ENS forms a scattered nerve network mainly between and around the muscular fibers. In the cardiac region, a large concentration of neurons and nervous fibers is observed, mainly between the muscular fibers. In the gizzard the AChE-positive neurons are fewer in number. The AChE-positive cells and fibers constitute the pyloric plexus, which extends continuously into the intestinal and rectum plexuses, and shows a uniform distribution throughout the organ. The enteric nerve fibers running within the musculature of these regions display little AChE activity, compared to the submucosa layer. Thin AChE reactive nerve fibers are also observed surrounding some unstained nerve cell bodies located in the SP and in the single unstained neurons in the MP. Extrinsic fibers with AChE activity are also detected running along the surface of muscle cells in the circular smooth muscle layer. There is a notable presence of AChE activity in the glial cells processes. In the nerve strands, AChE-positive glial processes are observed around the multiaxonal bundles, like a glial sheath. Some of these labeled glial processes form flat endfeet partially surrounding unlabeled single neurons or the ganglionic edge. However, simultaneous staining of both AChE and GFAP immunoactivity is important to confirm these observations.

Distribution of NADPHd (Figure 2)

Neurons and fibers with NADPHd activity are found in the SP and MP of the mid and hindgut. The extrinsic nerves of the GI in *M. abbreviatus* also show NADPHd activity. Axons from the Gb and Rn spread into the muscular layer and also project to the stg, gastric, pyloric and cardiac ganglia, where some neurons are enveloped by NADPHd-positive axonal terminals. There are two NADPHd-positive neurons in the STg (20 – 30 μm), three in the Cg (20 – 40 μm), and one each in the Gg and Pg (20 - 40 μm). Occasionally, NADPHd-reactive open-type neuron-like intraepithelial cells and small neurons are found in the stomach, intestine and rectum of the *M. abbreviatus*. Most of the labeled intraepithelial cells are cylindrical in shape and their processes spread to the base of the epithelium, forming an intraepithelial nerve plexus. Other processes from these cells extend beneath the lamina propria. Labeled nerve fibers are richly ramified in the mucosal layer, SP and MP. Regular clusters of NADPHd-positive neurons are found throughout the submucosa layer, constituting loose microganglia composed predominantly of multipolar and fusiform cells. Single medium unipolar or small bipolar NADPHd-positive neurons are observed among the microganglia, but in the gastric-esophageal and gastric-intestinal junctions bipolar, putative sensory neurons are located in a subepithelial position with their processes running to the MP. NADPHd-reactive nerve fibers are distributed in the SP, partially innervating unlabeled perikarya and partially running along the surface of the circular muscle layer. In the MP, NADPHd-reactive neurons are distributed between the circular and longitudinal muscular layers and occur mainly in singly or more rarely in groups of 3 – 5 cells with their projections extending to the muscular layer. Small unipolar neurons predominate, but small and medium multipolar and a few medium bipolar neurons are also present. Thin NADPHd-reactive nerve fibers surround unstained nerve cell bodies in the MP. The pro-ventricle MP is a scattered nerve network with NADPHd-reactive nerve fibers mainly located between and around the muscular fibers. In the cardiac and pyloric regions, there is a large concentration of neurons and nervous fibers,

mainly between the muscular fibers. In the gizzard, there are a few NADPHd reactive neurons and the nervous fibers have a thin diameter. The intestine and rectum plexuses constitute a continuous network together with the pyloric plexus which is uniform in appearance throughout the organ. The NADPHd-positive nerve fibers participate in the innervation of the entire mass of smooth muscle elements within the GI wall of *Megalobulimus*. Most of the stained nerve fibers are oriented in parallel to the muscular elements, especially in superficial circular muscular layers of the tract. The dense nerve-mesh is formed both by neuronal processes of the tract wall and by axons from neurons located in the CNS and/or along the nerves innervating the *Megalobulimus* GI. A larger number of fibers are found in the two typhlosoles of the pro-intestine. As with the AChE histochemistry, NADPHd activity is seen to stain all the glial cells and their processes. NADPHd-reactive glial processes are observed around the nerve strands and unlabeled single neurons or ganglia, forming a glial ensheathment. Nevertheless, to confirm these observations, simultaneous staining of NADPHd or NOS and GFAP immunoactivities is necessary.

GA histofluorescence (Figure 3)

GA-induced blue fluorescence is observed in the nerve fibers and varicosities in the mid and hindgut of *M. abbreviatus*, indicating the presence of catecholaminergic elements in both the SP and MP. No characteristic yellow fluorescence is observed, indicating the absence of indolamines. Fluorescent fibers are scarce and distributed throughout the *Megalobulimus* GI. The fiber varicosities appear as fluorescent pinpoints and, in fact, most of the fluorescent structures are distinguishable by these fluorescent dots of variable sizes that in some instances can be seen to be connected. The largest number of intense blue fluorescent fibers is found in the rectum, pro-ventricle and post-intestine located within the submucosal layer on the luminal side of the muscle layer and a few blue fluorescent fibers are observed in the pro and

mid-intestine. Smaller nerve bundles are occasionally seen to diverge toward the inner layers of the digestive tract, ending within the connective tissue layer, but are never seen to reach the mucosal layer. In the STNS, the blue fluorescence is mainly located in fibers and, occasionally, small intense fluorescent varicosities are found within the fiber networks in the STg, Cg, Gg and Pg.

FMRFa containing nerve cells (Figure 4)

The FMRFa-ir is widely found in the mid and hindgut of the *M. abbreviatus*. Both neuronal bodies and a large number of immunoreactive neurites are found within the mucosal, submucosa and muscular layers. From the CNS, through Gb and the Rn, thin nerve branches penetrate the wall of the tract. Thick FMRFa-ir afferent fibers from the Gb and Rn are also observed, giving off side branches in the submucosal layer, which indicates that FMRFa-ir fibers of central origin might also reach the GI, as do AChE and NADPHd fibers. FMRFa-ir neurons and nerve branches are also observed in the STNS. There are two FMRFa-ir neurons in the STg (20 – 30 μ m), whereas the Cg, Pg and Gg each contain one FMRFa-ir neuron whose diameter ranges between 20 - 40 μ m. The distribution of the FMRFa-ir neurons is uneven along the *Megalobulimus* GI. The enteric plexus in the mid and hindgut contains a few unipolar and bipolar neurons, although some multipolar ones can also be seen. They are present along the whole length of the *Megalobulimus* GI. In the mucosal layer, numerous small bipolar cell bodies can be seen distributed evenly throughout the GI. Their processes present varicosities and run close to or passed over other labeled processes and cell bodies, giving the appearance of a subepithelial plexus. In addition to the subepithelial plexus, open and closed type neuron-like intraepithelial cells can be observed in the epithelial layer of the *Megalobulimus* GI. FMRFa-ir cell bodies are also seen throughout the submucosal layer. Small unipolar and small and medium bipolar and multipolar FMRFa-ir neurons innervate

both the circular and longitudinal muscle layers. Fine varicose FMRFa-ir nerve fibers can also be seen surrounding non-immunoreactive nerve cell bodies along the plexuses. Small unipolar and bipolar FMRFa-ir neurons can be seen located along the thick and thin nerve bundles. Multipolar immunoreactive cell bodies also occurred between the nerve bundles. The whole GI tract has thick longitudinal FMRFa-ir nerve fibers, often branched and anastomosed to form a network, running parallel to the muscular layer. Nerve terminals present numerous varicosities and appear to contact circular and longitudinal muscular fibers. The density of the FMRFa-ir neuron population was found to be greatest in the pro-ventricle and intestine, but the plexus is better developed in these regions than in other parts of the gut. Labeled nerve fibers are richly ramified in the subepithelial, SP and MP plexuses, with the highest density located at the gastric-esophageal and gastric-midintestinal junctions. In the pro-ventricle, both plexuses contain FMRFa-ir elements and the labeled varicosities are lined up in the inner and outer layer of the plexus. FMRFa-ir neurons show a scattered distribution in the gizzard plexus and the most of the plexus is situated under the epithelial layer; whereas some elements can be found on the surface of the muscle layer or among the muscle cells. Occasionally, perpendicularly oriented fibers run across the muscle layer in the gizzard. In the intestine, extrinsic bundles of immunoreactive axons and a network of varicose fibers are found with FMRFa-ir bipolar neurons located mainly along the axon bundles, with their axons extending to other bundles. In the rectum, small and medium unipolar FMRFa-ir neurons predominate while small bipolar and medium multipolar neurons can also be detected with FMRFa-ir nerve fibers forming an extensive network with many varicose fibers whose nerve terminals appear to be related to circular and longitudinal muscular fibers.

Distribution of 5HT-ir neurons (Figure 5)

As with FMRFamide, thin nerve branches from the CNS project through the Gb and Rn and enter the outer wall of the *Megalobulimus* GI. In these branches, numerous thin and thick 5HT-ir fibers can be seen. These thick extrinsic 5HT-ir fibers enter the main nerve bundles of the enteric nerve-mesh in both the longitudinal and circular muscles and in the submucosal layer and give off fine varicose arborizations within the bundles. Whereas, in the MP some thin extrinsic 5HT-ir fibers with varicosities penetrate the longitudinal muscles and the circular muscle layer, 5HT-ir fibers run in the bundles and also surround non-immunoreactive cell bodies. In addition, 5HT-ir STNS neurons send neurites to the stomach wall. There are two 5HT-ir neurons in the STg (20 – 30 μm), three in the Cg (20 – 40 μm) and the Gg and Pg contain one 5HT-ir neuron each (15 and 20 μm , respectively). 5HT-ir neurons and fibers can be observed in the mucosal, submucosal and muscular layers of the mid and hindgut in *Megalobulimus*. The submucosal layer contains the largest number of 5HT-ir neurons. Nevertheless, there are great variations in the distribution and density of 5HT-ir neurons in the different regions of the *Megalobulimus* GI. More 5HT-ir neuronal elements were found in the intestine and rectum than in the pro-ventricle and gizzard. Throughout the GI, most of the 5HT-ir neurons are small and medium bipolar and located in the submucosal layer. In the midgut, small unipolar neurons are scattered in the longitudinal muscle layer, with the largest number located at the gastric-intestinal junction. Thin 5HT-ir fibers with varicosities run close to or over other labeled processes and cell bodies, giving the appearance of a subepithelial plexus, similarly to FMRFa-ir. There is also open and closed-type neuron-like intraepithelial cells 5HT-ir in the epithelial layer of the *Megalobulimus* GI. In all regions of the *Megalobulimus* GI, most of these immunoreactive cells are of the open-type and show an apical projection from the lumen. The basal processes are spread in the base of epithelium and form an intraepithelial nerve plexus and some processes leave the epithelium and run to underlying connective tissue.

Glial cells in the STNS and ENS (Figure 6)

GFAP immunoreaction (GFAP-ir) is intense in the GI of *Megalobulimus* and forms a large and widespread network throughout the GI. Enteric glial cells are small in size, with smaller diameters between 2 – 3 μm or larger diameters between 4 – 5 μm , a stellate or irregular-shape and numerous processes of various lengths and shapes. The enteric glial cells show intense GFAP-ir in the mid and hindgut wall. Some cells bodies occur in small groups in the SP and MP, but some cells are projected across the entire width of the epithelial layer, although their distribution is uneven in different parts of the gut. The nerves, neurons and ganglia of the STNS and ENS are ensheathed by glial cells processes. In the STNS and ENS, GFAP-ir cell processes appear lines along the nerve fibers. These processes are continuous with or cross other processes in the submucosa and muscular layers and in the nerve strand, glial processes ensheath multi-axonal bundles. In all regions of the GI, glial cell processes surround the neuronal somata and form a continuous layer between the epithelial basal lamina and the neuronal bodies.

Discussion

The gastrointestinal tract (GI) is an organ to which various functions are assigned, such as propulsion of luminal content, food digestion, secretion and absorption of electrolytes, absorption and transport of nutrients and elimination of “waste” substances, as is commonly described either for superior invertebrates (free-living forms) as for vertebrates (Barnes et al. 2001; Randall et al. 2001). In order to provide the wide variety of functions, the gut comprises different functional regions and neural mechanisms play essential roles in the regulation of this complex system. The major regulator of gastrointestinal function is the enteric nervous system (ENS), modulated by extrinsic (neural and/or hormonal) control (Randall et al. 2001).

The multifunctional importance of the enteric plexuses is consistent with the plurichemical neurotransmission of the enteric neural circuits described for mammals (Costa and Brookes 2008). In the present study, each segment of the midgut and hindgut of the snail *M. abbreviatus* showed positive enzymatic or immunohistochemical reactions which possibly demonstrate only a part of a rich chemical transmission existent in this enteric circuit.

Neurochemical approaches have demonstrated the presence of several signal molecules in the digestive region of the peripheral nervous system (PNS) in gastropods (Elekes et al. 1994; Giardino et al. 1996; Moroz and Gillette, 1996; Fujisawa et al. 1999; Furukawa et al. 2001; Morishita et al. 2003; Röszer et al. 2006).

According to our findings, thick fibers with AChE and NADPHd activity, catecholamines, 5HT-ir and FMRFa-ir from the Gb and Rn enter in the muscular and submucosa layers. In fact, serotonergic, catecholaminergic and FMRFamide-containing neurons have been demonstrated in ganglion neurons of the subesophageal complex that project through the visceral nerves in several pulmonate snails (Croll 1988; Hernádi *et al.*, 1998; Marsden and Kerkut 1970; S-Rózsa et al. 1986), including *Megalobulimus* (Moriguchi-Jeckel 2001; Zancan et al. 1997). The group of neurons found along the posterior margin of the visceral ganglion, retrogradely labeled from the Gb and Rn of *M. abbreviatus*, coincides with the neuronal group identified as serotonergic neurons in this species (Zancan et al. 1997). It has been shown that the visceroparietal ganglion complex of *Helix* contains numerous serotonergic neurons and that the intestinal nerve is richly supplied by 5HT-ir axon processes (Hernádi et al. 1998; S-Rózsa et al. 1986). A considerable group of neurons showing intense AChE activity was found in the anterior portion of the visceral and right parietal ganglia of *M. abbreviatus* (Zancan et al. 1994), and this neuronal group seems similar to the identified neurons that send axons through both the Gb and Rn (Martinez-Pereira et al. 2012, *in press*). Although the presence of AChE activity does not mean that the neurons are cholinergic in

nature, we cannot discard a possible participation of central cholinergic neurons in the innervation of the GI. The remarkably large population of neurons containing FMRFa-ir in the visceral ganglion and parietal ganglia of *M. abbreviatus* (Moriguchi-Jeckel 2001), with some of them located in the same portions of neurons retrogradely labeled from the Gb and Rn, allows us to assert with great confidence that this peptidergic system regulates the GI functions. Recently, Rigon et al. (2009 and 2010) identified neurons with NADPHd activity in the CNS of *M. abbreviatus*. The location of the NADPHd reactive neurons in the visceroparietal ganglion complex is similar to that of the neurons backfilled from the Gb and Rn. In *Pleurobranchia*, NADPHd-positive axonal processes are found in peripheral nerves, with highest intensity in the stomatogastric nerves and two giant visceral neurons (V1 and V2) showed relatively weak NADPHd staining (Moroz and Gillette 1996). These and other studies indirectly indicate the possible involvement of nitric oxide (NO) in the central control regulation of the GI in *M. abbreviatus*, just as its involvement, together with other neurotransmitters, has already been established in the modulation of the central circuit of feeding behavior in gastropods (Sadamoto et al. 1998; Moroz 2000; Elliott and Susswein 2002).

As with the morphology, the chemical coding of the STNS in gastropods is unclear. In *Aplysia*, neurons and nerve fibers show immunoreactivity to small cardioactive peptide (Lloyd et al. 1988), *Mytilus* inhibitory peptide (Fujisawa et al. 1999) and cardioexcitatory peptide NdWFamide (Morishita et al. 2003) while enterin-immunoreactivity is only seen in nerve fibers (Furukawa et al. 2001). However, it is important to remember that for these authors the STNS is a component of the ENS, which leads us to speculate that the chemical coding is the same in both systems. This may explain the presence of the cholinergic, monoaminergic, peptidergic and nitrenergic nervous elements observed in the STNS of *M. abbreviatus*.

The small number of neurons in the STNS of *Megalobulimus* resembles that described in the stg of crustaceans (Mulloney and Hall 1990; Skiebe et al. 1999; Tierney et al. 1997) and earthworms (Barná et al. 2001) rather than that of the insects (Klemm et al. 1986). The neurons identified in the STNS of annelids and arthropods revealed the neurochemical diversity of this extrinsic control system of gastric and intestinal functions in these animal groups (Barná et al. 2001; Ierusalimsky and Balaban 2006; Katz 2007; Klemm et al. 1986; Meyrand and Marder 1991; Selverston and Moulins 1987; Skiebe 2001; Swensen et al. 2000).

The immunoreactivity to 5HT and FMRFa found in the neuronal somata and fibers of STNS of the *M. abbreviatus* indicates a possible direct serotonergic and peptidergic control of the gastric functions. In the crustaceans (Kushner and Barker 1983; Mulloney and Hall 1990; Skiebe et al. 1999; Tierney et al. 1997), earthworm (Barná et al. 2001) and insects (Klemm et al. 1986) 5HT is an important transmitter in the stg. The colocalization of peptides, like FMRFamide-like peptides, with classical transmitters, such as the biogenic amines is commonly described in the invertebrate neurons, including the STNS of crustaceans in whose system inhibitory or excitatory modulation by neuropeptides has been demonstrated (Christie et al., 2004; Skiebe 2003). In *Megalobulimus*, a small number of neurons in the STNS appeared to be labeled by the different techniques used in this study which indicates the need for a confocal approach to investigate the possibility of co-transmission, as has been previously described in the PNS of others snails (Elekes et al. 1994; Röszer et al. 2006; Serfözö et al. 2008). Cholinergic motoneurons and interneurons have also been described in the STNS of decapod crustaceans (Tazaki and Sakai 1998). The AChE reactivity in this system could suggest a cholinergic role in the STNS of the snail *Megalobulimus*. The pharmacological effects of the different signal molecules on the STNS of *Megalobulimus* are not known and need also to be investigated.

Many signal molecules are located in cell bodies in both the STNS and enteric plexus in the whole gut. Despite the importance of ACh transmission in the enteric and gut of the gastropods, most studies report its physiological and pharmacological modulation in the GI functions (Baux and Tauc 1983; Lloyd and Church 1994; Perry et al. 1998; Roszer et al. 2009). Nevertheless, our findings show that the myenteric and submucosal networks of AChE-reactive neurons resemble the distribution observed with the NADPHd-positive neurons in the same plexuses. A study in the snail *Helix pomatia* indicates that ACh can decrease neuronal NO synthesis in the myenteric plexus (Roszer et al. 2009). This may explain the correlation of the localizations of these two enzymes in the enteric plexus of the *M. abbreviatus*.

The NADPHd reactive myenteric and submucosal networks in the mid-intestinal segments of *M. abbreviatus* is more complex than that of *Helix lucorum*, which is the most widely investigated snail (Röszer et al. 2004). As in the *Helix* GI (Halasy et al. 1988), in *Megalobulimus* a diaphorase reaction outlined the presence of cell bodies arranged into small ganglion-like structures that are interconnected by fiber tracts. However, in the GI of *Helix pomatia*, Serfözö et al (2008) described that NADPHd-reactive neuronal perikarya innervation is restricted to the cecum nerve plexus, which appears not to be the case in *M. abbreviatus* GI, because the enteric nervous network shows NADPHd-positive neurons distributed throughout the tract. Röszer and colleagues (2004a) suggest that the structure and developmental state of the NADPHd-reactive putative NO forming enteral network is not conserved in stylommatophoran species. Moreover, they report that the number of NADPHd labeled cells seems to be related to body weight, so that the NADPHd-positive innervation of visceral muscles decreased in relation to lower body weight in the investigated stylommatophoran species. In another study, the nerve fibers that innervated muscle elements in *Achatina fulica* and *Littorina littorea* had a very intense NADPHd activity (Zaitseva and

Filimonova 2006; Zaitseva and Kuznetsova 2008; Zaitseva and Markosova 2008; Zaitseva et al. 2009). In fact, the intense NADPHd innervation observed in the muscular layer of the *Megalobulimus* GI may be related to the size of this animal (see material and methods).

The largest number of FMRFa-ir cell bodies was located in the mucosal layer, where the small bipolar neurons showed a homogenous distribution, constituting a neural plexus with immunoreactive cell bodies and axons with varicosities. In the submucosal and muscular layers, FMRFa-ir cell bodies were randomly distributed along nerve trunks, and their projections branched into the nerve trunks and among muscle fibers. The distribution of FMRFa-ir and 5HT-ir cell bodies in *M. abbreviatus* is different that of *Helix* (Elekes and Ude 1994; Hernádi et al. 1998). In contrast to the distribution of FMRFa-ir, the 5HT-ir cell bodies were only detected in the submucosal layer. NADPHd-positive neurons and FMRFa-containing fibers were found in close proximity to the ENS of *Megalobulimus*. Röszer et al (2006) has proposed a new action mechanism for the FMRFa-induced physiological alterations in the mid-intestinal nervous system of gastropod species: FMRFa evokes NO liberation from NOS-containing neurons in the ENS. The present study provides a functional demonstration of the morphological interaction between NO secretion and FMRFa-containing neurons in the ENS of *Megalobulimus*.

In *Megalobulimus*, the largest number of 5-HT-ir perikarya neurons was found in the submucosal layer and neuronal elements were more prevalent in the hindgut and post-intestine than in the midgut. Thus, the 5HTergic innervation of midgut and hindgut must arise from the CNS or STNS, whereas the hindgut receives both extrinsic (from the Rn) and intrinsic 5HTergic innervation. The presence of intrinsic 5HT-containing neurons in the alimentary tract of invertebrates is not common. In gastropods, such as *Helix* (Hernádi et al. 1998), the 5HTergic innervation of the gut is of exclusively extrinsic origin, but in earthworms an intrinsic origin is described (Barná et al. 2001). In the STNS and in the enteric

plexus of *Megalobulimus* the 5HT-ir neurons seemed to also show NADPHd activity. In *Lymnaea stagnalis* there are 5HT-ir and NADPHd-positive neurons and fibers containing both transmitters in the central feeding circuitry (Sadamoto et al. 1998).

The presence of catecholaminergic nerve fibers in the intestine of *M. abbreviatus* was demonstrated in the present study using fluorescence histochemistry with GA. This procedure was unable to detect 5HT elements in the ENS. There is a great deal of biochemical evidence to show that dopamine is the most abundant catecholamine in the nervous system of several species of gastropods (Dahl et al. 1966; Guthrie et al. 1975; Gospe 1983; Hetherington et al. 1994; Ottaviani et al. 1988; Straub and Kuhlmann 1984; Trimble et al. 1984), so the blue fluorescent fibers probably contain dopamine. The octopamine can be also considered, because it is reported in PNS of gastropods (Kupfermann et al. 1971; Ruben et al. 1979). Norepinephrine and epinephrine are detected in very small quantities in snails (Osborne 1984). In *Chione stutchburyi* the gut contains appreciable quantities of dopamine, which varicose nerve fibers mainly run along the longitudinal axis of the gut (Mercer and McGregor 1981). Even in the alimentary tract of *Helix*, the dopamine-containing cells are detected in the submucosal layer and are confined to the longitudinal muscle trabeculae (Hernádi et al. 1998). We not detect dopamine fibers of central origin. Therefore, it is suggested that the catecholaminergic neuronal elements observed are intrinsic components of the ENS. In *M. abbreviatus* most of the fluorescence was observed in the rectum and stomach and no perikarya were observed in the ENS of these regions.

In addition to the enteric plexus, epithelial cells with AChE and NADPHd activity, and 5HT and FMRF immunoreactivity are found along the midgut and hindgut. Similar cells have been demonstrated in the epithelium of the alimentary tract of *Littorina littorea*, *Achatina fulica*, *Cryptonatica clausa*, *Buccinum undatum*, *Dendronotus arborescens*, *Coryphella rufibranchialis*, *Helix pomatia* and in the slug *Deroceras reticulatum* (Zaitseva 2005; Zaitseva

and Filimonova 2006; Zaitseva and Kuznetsova 2008; Zaitseva and Markosova 2008; Zaitseva et al. 2009). Based on its location and morphology, these reports have postulated a sensory and/or an endocrine function for these intraepithelial cells. The characteristics of these cells found in *Megalobulimus* also support this hypothesis. Ultrastructural data on these intraepithelial cells found in ENS could clarify their function.

In a previous study, we describe the existence of fusiform cells in the ENS of *M. abbreviatus* (Martinez-Pereira et al. 2012, *in press*), which is not mentioned in the literature for gastropods. However, given their morphological similarity and their location, we can speculate that they may represent evidence of the appearance of interstitial cells of Cajal in the GI of invertebrates. These small neurons or minineurons also showed AChE and NADPHd activity, blue fluorescence and immunoreactivity to 5HT and FMRFamide in the enteric plexus. These fusiform cells are the same as those observed in the neuronal and fibers in the enteric plexus.

Our results demonstrate the presence of GFAP-like material. The absence of immunoreactivity in the incubation without the antibody to GFAP, permits us to assume that glial cells are present throughout enteric plexi of the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. We are not aware of any studies that have investigated a peripheral population of glial cells in gastropods. There are reports concerning the role of glial cells in insects in the ENS neurogenesis (Copenhaver 2007). In mammals, the glial cells participate in the control of gut motility and others functions of the GI neural circuits. In fact, from a traditional point of view these cells are perceived as having a simple mechanical support function, hence constituting mere spectators of events. Nevertheless, it can be hypothesized that the enteric glial cells might play a more active role than previously thought in the complex organization of the motor activity of the GI (Bassotti et al 2007ab; Rühl 2005; Silveira et al. 2007). There is even evidence that enteric glial cells have a neuroplastic role besides their other functions in the

enteric complex organization (Bassotti et al 2007ab). Considering that the enteric plexus is a phylogenetically conserved form of innervation, and the roles of glial cells are already well established in molluscs and arthropods, it is not surprising to find glial functions in the visceral innervation even in invertebrate groups. The presence of NADPHd and AChE-positive terminal glial processes ensheathing the neuronal body suggests that, as in the CNS, NO and ACh may mediate neuron-glial communication (Peruzzi et al. 2004).

The data obtained from the neurochemical approaches used in the GI of *Megalobulimus abbreviatus* can be resumed as follows. (i) The axons innervating the gut wall originate from the CNS, via Gb and Rn may be 5HT-ir and have FMRFamide-like peptides. Although the AChE and NADPHd histochemistry was mainly used in this research to study the plexus organization, because of their intense enzymatic reactions, we cannot discard a probable nitrenergic and cholinergic nature of some axons that innervate the GI wall. (ii) The STNS have neurons that project to the stomach and intestine wall with 5HT-ir and FMRFamide-like peptide. This form of GI extrinsic innervation probably also includes cholinergic and nitrenergic elements. (iii) The submucous and myenteric plexuses are constituted of a great number of neurons, neurites with 5HT-ir and FMRFamide-like peptide and with a possible nitrenergic or cholinergic nature. These different transmitter systems could exert putative roles in the motility or the secretomotor or sensorial functions of GI. A catecholaminergic system could also be involved in the sensorial or secretomotor functions. (iv) Neuron-like intraepithelial cells and fusiform cells, revealed with all approaches used here (except the GA method), could also constitute important constituents of the snail ENS and may have sensory and endocrine functions within the enteric circuit. The similarity between the minineurons and the interstitial cells of Cajal should be investigated in invertebrates. (v) Considering the observed GFAP immunoreactivity as evidence of the existence of enteric glial cells, the neural constituents of the snail GI wall interact with glia in a similar manner to that described in

invertebrate CNS and would represent a new approach to the study of the ENS in gastropods and other invertebrates. This accumulation of evidence suggests the need of developing a new hypothesis regarding the peripheral control of gastrointestinal functions in snails.

Acknowledgements

This research was supported by grants from Brazilian Coordination of Improvement of Higher Education (Capes) and Brazilian National Research Council (CNPq). We are grateful to Professor Paulo Ivo H. de Bittencourt Jr. for the use of the fluorescence microscope.

References

- Alba Y, Villaro AC, Sesma P, Vazquez JJ, Abaurrea A. 1988 Gut endocrine cells in the snail *Helix aspersa*. Gen Comp Endocrinol. 70(3):363-73.
- Barna J, Csoknya M, Lázás Zs, Barthó L, Hámori J. 2001. Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*, *Annelida*). J Neurocytol 30: 313 - 325.
- Barnes RSK., Calow PP, Olive PJW, Golding DW, Spicer JI. 2001. The Invertebrates: A Synthesis (cap 9: Feeding), Blackwell, 209-237.
- Bassotti G, Villanacci V, Antonelli E, Morelli A, Salerni B. 2007a. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? Lab Invest 87: 628-32.
- Bassotti G, Villanacci V, Fisogni S, Rossi E, Baronio P, Clerice C, Maurer CA, Cathomas G, Antonelli E. 2007b. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies. W J Gastroenterol 13(30):4035-41.
- Baux G, Tauc L 1983 Carbacol can be released at a cholinergic ganglionic synapse as a false transmitter. Proc Natl Acad Sci 80: 5126-28.
- Becquaert JC. 1948. Monograph of the family Strophocheilidae, a neotropical family of

- terrestrial mollusks. *Bull Mus Comp Zool Harvard* 100:1-210.
- Bullock TH, Horridge GA. 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*, San Francisco: Freeman and Co.
- Chase R. 2002. *Behavioral & its neural control in gastropod mollusks*, New York: Oxford University Press.
- Christie AE, Cain SD, Edwards JM, Clason TA, Cherny E, Lin M, Manhas AS, Sellereit KL, Cowan NG, Nold KA, Strassburg H-P, Graubard K. 2004. The anterior cardiac plexus: an intrinsic neurosecretory site within the stomatogastric nervous system of the crab *Cancer productus*. *J Exp Biol* 207: 1163-1182.
- Copenhaver PF. 2007. How to innervate a simple gut: familiar themes and unique aspects in the formation of the insect enteric nervous system. *Dev Dyn*. 236(7):1841-64.
- Costa M, Brookes SH. 2008. Architecture of enteric neural circuits involved in intestinal motility. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 12 (Suppl 1): 3-19.
- Croll RP. 1988. Distribution of monoamines within the central nervous system of the juvenile pulmonate snail, *Achatina fulica*. *Brain Research* 460 (1): 29-49.
- Dahl E, Falck B, Mecklenburg C, Myhrberg H, Rosengren E. 1966. Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some mollusca. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 71: 489-498.
- De La Torre JC, Surgeon JW. 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. *Histochemistry*, 49: 81-93.
- Elekes K, Hernádi L, Muren JE, Nässel DR. 1994. Peptidergic neurons in the snail *Helix pomatia* - Distribution of neurons in the central and peripheral nervous systems that react with an antibody raised to the insect neuropeptide, leucokinin-I. *J Comp Neurol* 341 (2): 257-272.

- Elekes K, Ude J. 1994 Peripheral Connections Of Fmrfamide-Like Immunoreactive Neurons In The Snail, *Helix-Pomatia* - An Immunogold Electron-Microscopic Study. *J Neurocytol* 23 (12): 758-769.
- Elliott, C.J., Susswein, A.J. 2002. Comparative neuroethology of feeding control in molluscs. *J Exp Biol.*, 205 (7): 877-96.
- Fujisawa Y, Furukawa Y, Ohta S, Ellis TA, Dembrow NC, Li L, Floyd PD, Sweedler JV, Minakata H, Nakamaru K, Morishita F, Matsushima O, Weiss KR, Vilim FS. 1999. The *Aplysia mytilus* inhibitory peptide-related peptides: identification, cloning, processing, distribution and action. *J. Neurosci* 19: 9618-9634.
- Furukawa Y, Nakamaru K, Wakayama H, Fujisawa Y, Minakata H, Ohta S, Morishita F, Matsushima O, Li L, Romanova E, Sweedler JV, Park JH, Romero A, Cropper EC, Dembrow NC, Jing J, Weiss KR, Vilim FS. 2001. The enterins: a novel family of neuropeptides isolated from the enteric nervous system and CNS of *Aplysia*. *J Neurosci* 21: 8247-8261.
- Giardino ND, Aloyz RS, Zollinger M, Miller MW, Desgroseillers L. 1996. L5-67 and LUQ-1 peptide precursors of *Aplysia californica*: Distribution and localization of immunoreactivity in the central nervous system and in peripheral tissues. *J. Comparative Neurology* 374 (2): 230-245.
- Gospe SM. 1983. Studies of dopamine pharmacology in molluscs. *Life Sci.* 33: 1945-1957.
- Guthrie PB, Neuhoff V, Osborne NN. 1975. Dopamine, noradrenaline, octopamine and tyrosine-hydroxylase in gastropod *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol (C)* 52: 109-111.
- Halasy K, Benedeczky I, Fekete E, Toth L, Gabriel R. 1988. Enteric neuromuscular junctions: comparison of ultrastructural features in different phylogenetic groups. *Neuroscience* 25(1):147-62.
- Hernádi L, Erdelyi L, Hiripi L, Elekes K. 1998. The organization of serotonin-, dopamine-,

- and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*. *J Neurocytol.* 27(10):761-75.
- Hetherington, MS., McKenzie, JD, Dean, HG, 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)* 107: 83-93.
- Ierusalimsky VN, Balaban PM. 2006. Immunoreactivity to molluskan neuropeptides in the central and stomatogastric nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Cell Tissue Res* 325:555-65.
- Ito S, Kurokawa M. 2002. Peripheral neural activities in the digestive system of *Aplysia*. *Zool Sci* 19: 1468.
- Ito S, Kurokawa M. 2007. Coordinated peripheral neuronal activities among the different regions of the digestive tract in *Aplysia*. *Zoo Sci* 24: 714–722.
- Jaeger CP. 1961. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp Biochem Physiol* 4: 30-32.
- Karnovsky MJ, Roots L. 1964. A “direct-coloring” method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 219-221
- Katz PS. 2007. Evolution and development of neural circuits in invertebrates. *Curr Op Neurobiol* 17: 59-64.
- Klemm N, Hustert R, Cantera R, Nassel DR. 1986. Neurons reactive to antibodies against serotonin in the stomatogastric nervous system and in the alimentary canal of locust and crickets (Orthoptera, Insecta). *Neuroscience* 17, 247–261.
- Kupfermann I, Pinsker H, Castellucci V, Kandel ER. 1971. Central and peripheral control of gill movements in *Aplysia*. *Science.* 174(15):1252-6.

- Kurokawa M, Ito S, Okamoto T 2008. Activities and functions of peripheral neurons in the enteric nervous system of *Aplysia* and *Lymnaea*. *Acta Biol Hung* 59: 65–71
- Kushner PD, Barker DL. 1983. A neurochemical description of the dopaminergic innervation of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. *Journal of Neurobiology* 14, 17–28.
- Lloyd PE, Church PJ. 1994. Cholinergic neuromuscular synapses in *Aplysia* have low endogenous Acetylcholinesterase activity and high-affinity uptake system for Acetylcholine. *J Neurosci* 14 (11): 6722-733.
- Lloyd PE, Kupfermann I, Weiss KR. 1988. Central peptidergic neurons regulate gut motility in *Aplysia*. *J Neurophysiol.* 59(5):1613-26.
- Marchand CR, Colard C. 1991. Presence of cells and fibers immunoreactive toward antibodies to different peptides or amine in the digestive tract of the snail *Helix aspersa*. *J Morphol* 201: 185-90.
- Marsden C, Kerkut GA. 1970. The occurrence of monoamines in *Planorbis corneus*: A fluorescence microscopic and microspectrometric study. *Comp. gen. Pharmac.* 1: 101-116.
- Martinez-Pereira MA, Franceschi RC, Antunes GF, Coelho BP, Achaval M, Zancan DM. 2012. General morphology and innervation of the midgut and hindgut of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata). *Zoo Sci (in press)*
- Mercer AR, McGregor DD. 1981. Innervation of the intestine in the bivalve mollusc *Chione stutchburyi*. *Cell Tissue Res* 218 (1): 191-207.
- Meyrand P, Marder E. 1991. Matching neural and muscle oscillators: Control by FMRFamide-like peptides. *Journal of Neuroscience* 11, 1150–1161.
- Moriguchi-Jeckel CM. 2001. Imunorreatividade a FRMF-amida no sistema nervoso central e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. [Dissertação de Mestrado] Porto Alegre, 90f. Ciências Biológicas: Neurociências – UFRGS.
- Morishita F, Nakanishi Y, Sasaki K, Kanemaru K, Furukawa Y, Matsushima O. 2003.

- Distribution of the *Aplysia* cardioexcitatory peptide, NdWFamide, in the central and peripheral nervous systems of *Aplysia*. *Cell Tissue Res* 312:95–111.
- Moroz L, Gillette R. 1996. NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. *J Comp Neurol* 367: 607–22.
- Moroz LL. 2000. Giant identified NO-releasing neurons and comparative histochemistry of putative nitrergic systems in gastropod molluscs. *Microsc Res Tech*. 49 (6): 557–69.
- Mulloney B, Hall WM. 1990. GABA-ergic neurons in the crayfish nervous system: An immunocytochemical census of the segmental ganglia and stomatogastric system. *Journal of Comparative Neurology* 291, 383–394.
- Okamoto T, Kurokawa M. 2010. The Role of the Peripheral Enteric Nervous System in the Control of Gut Motility in the Snail *Lymnaea stagnalis*. *Zoological Science* 27: 602–610
- Osborne NN. 1984. Phenylethanolamine-N-methyltransferase and dopamine- β -hydroxylase immunoreactivity and the occurrence of noradrenaline and adrenaline in the nervous system of the snail *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res* 237: 605–608.
- Ottaviani E, Caselgrandi E, Franchini A. 1988. Epinephrine investigation in the snail brain of *Helicella virgata* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp Biochem Physiol (C)* 89: 267–269.
- Perry SJ, Straub VA, Kemenes G, Santama N, Worster BM, Burke J F, Benjamin PR. 1998. Neural Modulation of Gut Motility by Myomodulin Peptides and Acetylcholine in the Snail *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 79: 2460–2474.
- Peruzzi E, Fontana G, Sonetti D. 2004. Presence and role of nitric oxide in the central nervous of the freshwater snail *Planorbarius corneus*: possible implication in neuron-microglia communication. *Brain Res.* 1005, 9–20.
- Punin MY, Zaitseva OV. 2002. The first data on the intestine nervous system organization in priapulids, *Dokl. Biol. Sci.* 387: 559–561.

- Punin MYu. 2001. The Gut Regulatory System of Invertebrates and Its Presumable Evolution in Multicellular Organisms: A Review, St. Petersburg.
- Randall D, Burggren W, French K. 2002. Eckert Animal Physiology. Acquiring Energy: Feeding, Digestion, and Metabolism (cap15). WH Freeman
- Rigon P, de Castilhos J, Molina CG, Zancan DM, Achaval M. 2010. Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the young and adult land snail *Megalobulimus abbreviatus*. Tissue and Cell, 42: 307–313.
- Rigon P, de Castilhos J, Saur L, Rodrigues MF, Achaval M, Xavier LL, 2009. NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus abbreviatus*: the involvement of pedal ganglia. Invert. Neurosci. 9 (3–4), 155–165.
- Röszer T, Józsa T, Szentmiklósi AJ, Bánfalvi G. 2009. Acetylcholine inhibits nitric oxide (NO) synthesis in the gastropod nervous system. Cell Tissue Res. 336, 325–335.
- Röszer T, Kiss-Tóth E, Petkó M, Szentmiklósi AJ, Bánfalvi G 2006. Phe-met-arg-phe (FMRF)-amide is a substrate source of NO synthase in the gastropod nervous system. Cell Tissue Res 325: 567-75.
- Röszer T, Kiss-Tóth E, Szentmiklósi AJ, Bánfalvi G. 2005. Seasonal periodicity of enteric nitric oxide synthesis and its regulation in the snail *Helix lucorum*. Invert Biol 124 (1): 18-26.
- Röszer T, Jenei Z, Serfözö Z, Czimmerer Z, Bánfalvi G. 2004a. Structural diversity of NADPH diaphorase-reactive enteral networks in Stylommatophora (Gastropoda, Pulmonata). Invert Biol 123(2): 128-35.
- Röszer T, Jenei Z, Gáll T, Nagy O, Czimmerer Z, Serfözö Z, Elekes K., Bánfalvi G. 2004b. A possible stimulatory effect of FMRFamide on neuronal nitric oxide production in the central nervous system of *Helix lucorum* L. Brain Behav. Evol. 63, 23–33.
- Röszer T, Czimmerer Z, Szentmiklósi AJ, Bánfalvi G. 2004c. Nitric oxide synthesis is

- blocked in the central nervous system during dormant periods of the snail *Helix lucorum*. *Cell Tissue Res.* 316, 255–262.
- Ruben PC, Swann JW, Carpenter DO. 1979. Neurotransmitter receptors on gill muscle fibers and the gill peripheral nerve plexus in *Aplysia*. *Can J Physiol Pharmacol.* 57(10):1088-97.
- Rühl A. 2005. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil* 17: 777-90.
- Sadamoto H, Hatakeyama D, Kojima S, Fujito Y, Ito E. 1998. Histochemical study on the relation between NO-generative neurons and central circuitry for feeding in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Res.* 32(1):57-63.
- Salimova NB, Sakharov DA, Milosevic I, Turpaev TM, Rakic L. 1987. Monoamine-containing neurons in *Aplysia* brain. *Brain Res.* 400:285-299.
- Selverston AI, Moulins M. 1987. *The Crustacean Stomatogastric System*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Serfösö Z, Szentmiklósi AJ, Elekes K. 2008. Characterization of nitric oxidergic neurons in the alimentary tract of the snail *Helix pomatia* L.: histochemical and physiological study. *J. Comp. Neurol.* 506, 801–821.
- Silveira ABM, Lemos EM, Adad S, Correia-Oliveira R, Furness JB, Reis DD'A. 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves and glial cells. *Hum Pathol* 38: 1256-64.
- Skiebe P, Dietel C, Schmidt M. 1999. Immunocytochemical localization of FLRFamide-, proctolin- and CCAP-like peptides in the stomatogastric nervous system and neurohemal structures of the crayfish, *Cherax destructor*. *J Comparative Neurology* 414, 511–532.
- Skiebe P. 2003. Neuropeptides in the crayfish stomatogastric nervous system. *Microsc Res and Techn* 60 (3): 302–312.
- Skiebe P 2001. Neuropeptides are ubiquitous chemical mediators: using the stomatogastric nervous system as a model system. *Journal of Experimental Biology* 204: 2035-2048.

- S.-Rózsa K, Hernádi L, Kemenes Gy. 1986. Selective *in vivo* labelling of serotonergic neurones by 5,6-dihydroxytryptamine in the snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 85: 419-425.
- S-Rózsa K. 1984. The pharmacology of molluscan neurons. *Progress in Neurobiology* 23, 79–150.
- Sternberger L.A. 1979. *Immunocytochemistry*. Chichester: John Wiley.
- Straub H, Kuhlmann D. 1984. Identification and quantitative measurements of biogenic monoamines in the central nervous tissue of some gastropods. *Comp Biochem Physiol (C)* 78: 319-323.
- Swensen AM, Golowasch J, Christie AE, Coleman MJ, Nusbaum MP, Marder E. 2000. GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.* 203, 2075–2092.
- Tazaki K, Sakai K. 1998. Neurotransmitters of motor neurons in the stomatogastric ganglion of an isopod crustacean, *Ligia exotica*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 120: 579–586
- Tierney AJ, Blanck J, Mercier J. 1997. FMRFamide-like peptides in the crayfish (*Procambarus clarki*) stomatogastric nervous system: Distribution and effects on the pyloric motor pattern. *J. Exp Bio* 200: 3221–3233.
- Trimble DL, Barker DL, Ballard BJ. 1984. Dopamine in a molluscan nervous system: synthesis and fluorescence histochemistry. *J Neurobiol* 15: 27-36.
- Zaitseva OV, Kuznetsova TV. 2008. Distribution of acetylcholinesterase activity in the digestive system of the gastropod molluscs *Littorina littorea* and *Achatina fulica*. *Morfologija* 133(1):55-9.
- Zaitseva OV, Markosova TG. 2008. Acetylcholine, Nitric Oxide and Their Possible Colocalization in Regulatory Cells of the Digestive System of Gastropods. *Doklady Bio Sci.*

421: 248–250.

Zaitseva OV, Kuznetsova TV, Markosova TG. 2009. NADPH_Diaphorase Activity in the Digestive System of Gastropod Molluscs *Achatina fulica* and *Littorina littorea*. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 45(1): 125-137.

Zaitseva OV, Filimonova SA. 2006. Ultrastructure of Neural Cells and Neural Plexuses of the Digestive Tract in Gastropod Molluscs, *Dokl. RAN*: 409: 280-282.

Zaitseva OV. 2005. Nerve cells in the digestive tract epithelium of gastropods. *Doklady Biol Sci* 408: 220-22.

Zancan DM, Brauer M, Achaval M. 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp Biochem Physiol A* 118 (3): 765-772.

Zancan DM, Nóbrega HG, Severino AG, 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.

Figures legends

Fig. 1 AChE-activity in horizontal sections of the the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*.

a. Distribution of AChE-activity in the subepithelial, submucous and myenteric plexuses in the whole wall of the stomach, neuronal somata are located in the submucosa and muscular layers, while the nervous fibers are concentrated in the lamina propria. Small unipolar neurons predominates, but are also show a small multipolar neurons. **b.** Neuronal bodies with AChE-activity in the STNS, the neurons are showed in the stomatogastric, gastric and pyloric ganglia in the gizzard wall. **c-d.** The AChE-positive neuronal somata and fibers constitutes a dense nerve mesh in the MP in the muscular layer. **e-f.** The extrinsic nervous fibers branches out and anastomose with the fibers of SP and MP, and single neuronal soma or ganglia are sparsely located in both plexuses. **g-h.** Neuron-like intraepithelial cells of the open and closed types in the mucosa layer with AChE-activity. **i.** The subepithelial plexus show intense activity under the mucosal lamina propria. **j.** Glial processes with AChE-activity ensheated axonal bundles in the MP. *ml* muscular layer, *MP* myenteric plexus, *Se* subepithelial plexus, *SP* submucous plexus, *1* stomatogastric ganglion, *2* gastric ganglion, *3* pyloric ganglion. White arrowheads indicate neuronal somata, white arrow indicates nervous fibers, slim arrowheads shown ganglia in the plexuses, black arrows and inset indicate the open-type of neuron-like intraepithelial cells, asterisk indicates the closed-type of neuron-like intraepithelial cells and black arrowheads indicate glial processes. Scale bars: b 150µm; a, c, d, e, f 100µm; g, h, i, j and inset 10µm.

Fig. 2 Distribution of NADPHd-activity in the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. **a.** The submucous and myenteric plexuses show a rich staining in the nervous fibers in the mucosa, submucosa and muscular layers (horizontal sections). **b.** Thick extrinsic nervous fibers and thin intrinsic fibers in the muscular layer of the gizzard (horizontal sections). **c.** Whole mount

preparation of the intestine that show extrinsic fibers penetrate and run parallel to the muscle fibers in the intestine and anastomose with fibers of the SP and MP. **d.** NADPHd-reactive glial cell body with processes in the muscular layer (horizontal sections). **e.** NADPHd-reactive glial processes are observed around the nerve strands, like a glial ensheathment (horizontal sections). *MP* myenteric plexus, *SP* submucous plexus. White arrow indicates nervous fibers, black arrow indicates glial cell body and black arrowheads shown glial ensheathment. Scale bars: a, b, c, 100 μ m; d and e 10 μ m.

Fig. 3 Fluorescent induced by GA in horizontal sections of the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. **a.** Nervous fibers and varicosities in the submucosa of the post-intestine. **b, e-f.** The most fluorescence is observed in nervous fibers and varicosities in the submucosa layer and under the lamina propria of the mucosa in the rectum. The luminal epithelium and some regions of the submucosa showed a reddish autofluorescence. **c-d.** The pro-ventricle show a large amount of nervous fibers with blue fluorescent under the mucosa and in the submucosa and the varicosities are very scattered. Arrows indicate nervous fibers, arrowheads indicates varicosities and asterisk showed a reddish autofluorescence. The inset shows a “bunch” of varicosities. Scale bars: b and c 150 μ m; a 100 μ m; d, e and f 10 μ m.

Fig. 4 Distribution of FMRFa-ir neuronal elements in the *M. abbreviatus* GI. **a.** Topographical view of the subepithelial and submucous plexuses in the pro-ventricle showing the scattered network in both plexuses. Extrinsic and intrinsic neuronal fibers crosses the submucosal layer and penetrates in the mucosa or anastomose with the subepithelial plexus. Small bipolar neurons are present and project their axonal processes in different direction of the mucosa. **b.** Neurons in the stg and extrinsic fibers. **c.** Neurons in the gastric and pyloric ganglia and a nerve trunk running in the muscular layer. **d.** Extrinsic fiber entering and

crossing the muscular layer reaching the submucosa, small unipolar Fa-ir cell bodies can be seen along of the nerve trunk. **e.** Small unipolar and small multipolar Fa-ir neurons innervate both the circular and longitudinal muscle layers. **f.** In some portion of the submucosa, neurons and fibers are arranged along the longitudinal axis of the layer. **g.** Fa-ir neurons show mainly a scattered distribution in the gizzard plexus and various neurons no-Fa-ir are also seen. **h.** Subepithelial plexus in horizontal section of the intestine. **i.** Neuron-like intraepithelial cells of the closed type in the intestine, their processes contribute to the formation of the subepithelial plexus and anastomose to the fibers or neurons in the SP. **j.** Neuronal processes showed varicosities and run close to the lamina propria in the subepithelial plexus. Between the epithelial cells are present the neuron-like intraepithelial cells of the open type. *Fa-ir* FMRF-amide immunoreactivity, *SP* submucous plexus, *stg* stomatogastric ganglion, *1* gastric ganglion, *2* pyloric ganglion. White arrowheads indicate neuronal somata, white arrow indicates nervous fibers, black arrow indicate a nerve trunk, slim arrowheads indicate subepithelial plexus, black arrowhead indicates the neuron-like intraepithelial cells and asterisks indicate no-Fa-ir neurons. Scale bars: e, f, g and h 200 μ m; b, c and d 150 μ m; a and i 100 μ m; j 10 μ m.

Fig. 5 5HT-immunoreactivity in the midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. **a.** Neuronal somata 5HT-ir in the STg and gastro-pyloric ganglia. **b.** Numerous thick and thin 5HT-ir fibers can be seen in the submucosa and crosses between the longitudinal and circular muscles. **c.** Large nerve branches of central origin enter the muscular. They contain a few thick and numerous thin 5HT-ir fibers and runs to the mucosa. **d.** Two 5HT-ir neuron-like intraepithelial cells of the open type between the epithelial cells and showed cylindrical shape. **e.** Group of 5HT-ir neuron-like intraepithelial cells of the closed type and basal processes of different length located in the basal half of the epithelial layer. The basal processes of the

intraepithelial cells form the intraepithelial plexus and to project to the subepithelial layer, extending longitudinally along the lamina propria. **f.** In the muscle layer and lamina propria of the mucosa, thin fibers and varicose 5HT-ir can also be seen. **g.** Small 5HT-ir bipolar neurons and thin fibers in the subepithelial plexus. **h.** Thin fibers 5HT-ir running parallel to the mucosa. *5HT-ir* serotonin immunoreactivity, *stg* stomatogastric ganglion, *1 stg*, *2* gastric and pyloric ganglia. White arrowheads indicate neuronal somata, white arrows indicate nervous fibers, black arrow indicates intraepithelial plexus, black arrowheads indicate varicosities and black asterisks indicate the neuron-like intraepithelial cells. Scale bars: b, c, g and h 100 μ m; a, e and f 50 μ m; d 20 μ m.

Fig. 6 GFAP-ir in horizontal sections of midgut and hindgut of *M. abbreviatus*. **a.** In the mucosa and submucosa of the midgut and hindgut are observed a glial lacunar network constituted by bodies and processes. **b.** Cell and processes GFAP-ir are detected as evident lines along the muscular fibers. **c.** Enteric-glial cells are small size and a stellate or irregular-shaped with numerous processes of various length and shape. **d.** The cell processes GFAP-ir are continuous with or cross other processes in the submucosa and muscular layers and in the nerve strands glial processes ensheath multiaxonal bundles. *GFAP-ir* GFAP-immunoreactivity, *mb* multiaxonal bundles. Arrowheads indicate glial cells bodies and arrows indicate glial processes. Scale bars: a-d 50 μ m.

Figure 1

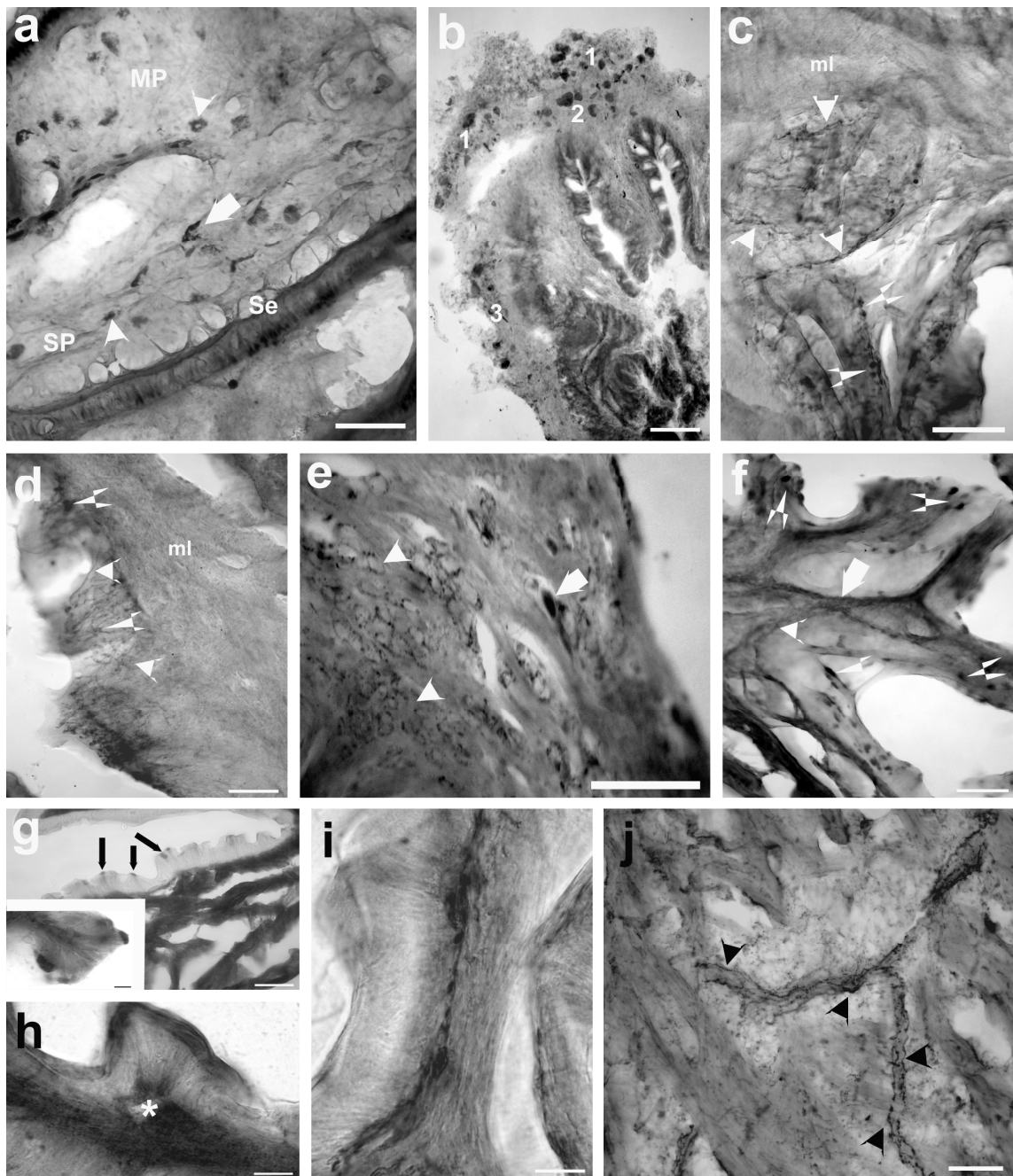


Figure 2

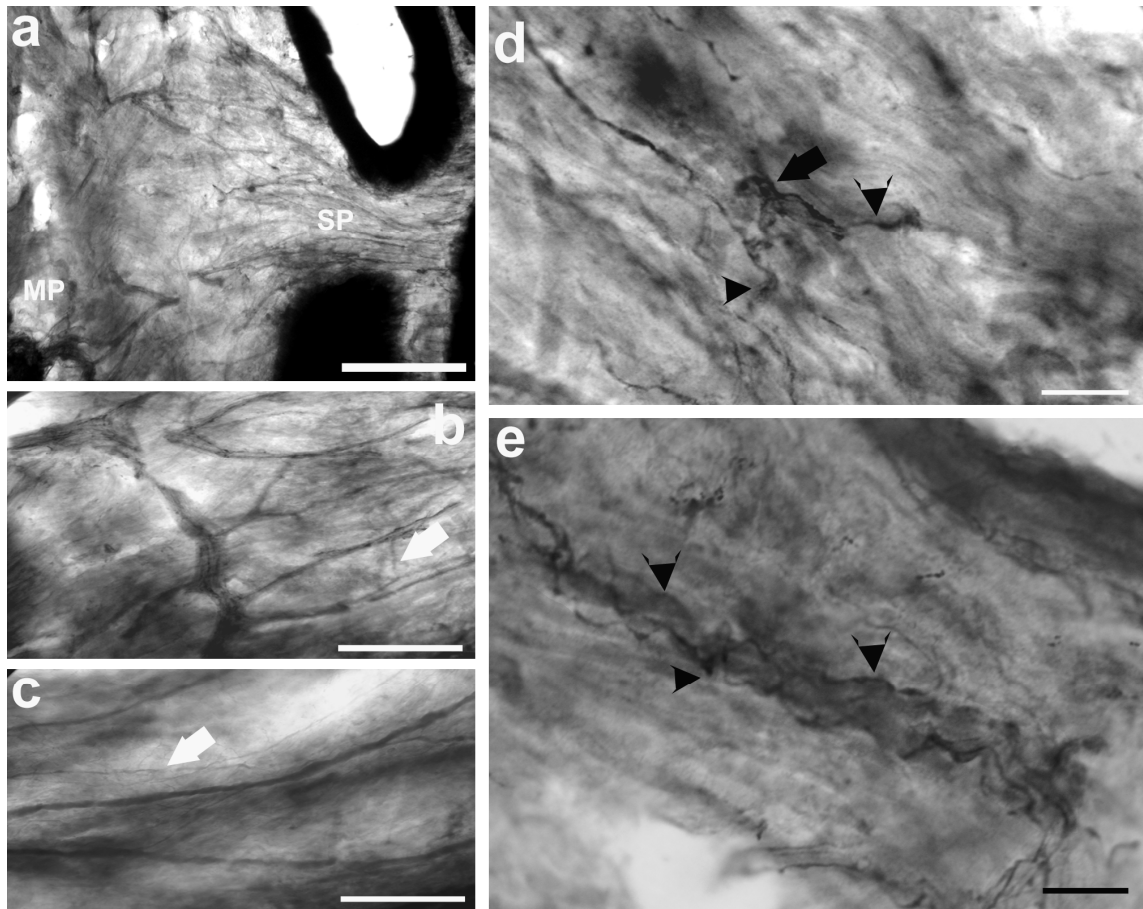


Figure 3

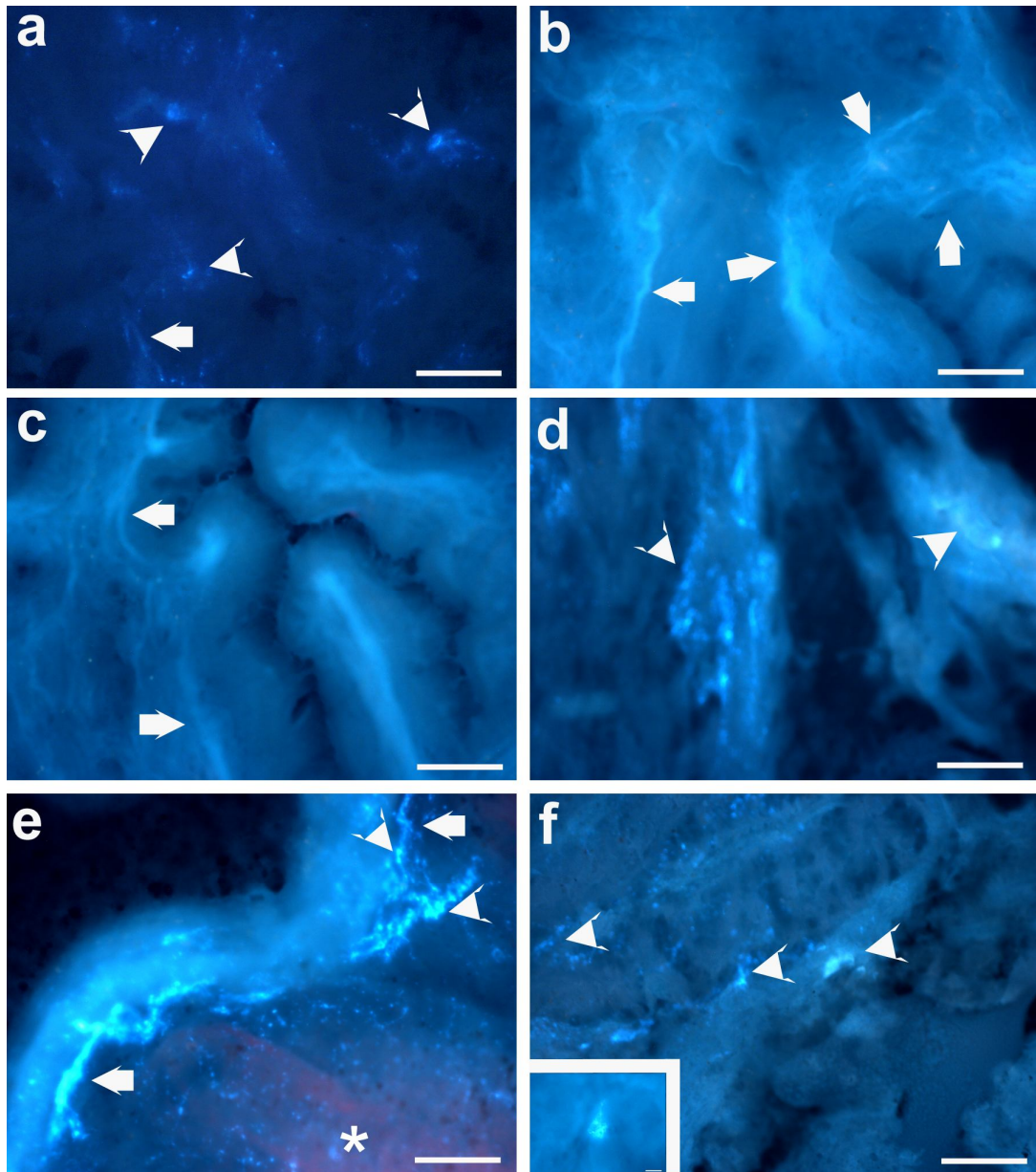


Figure 4

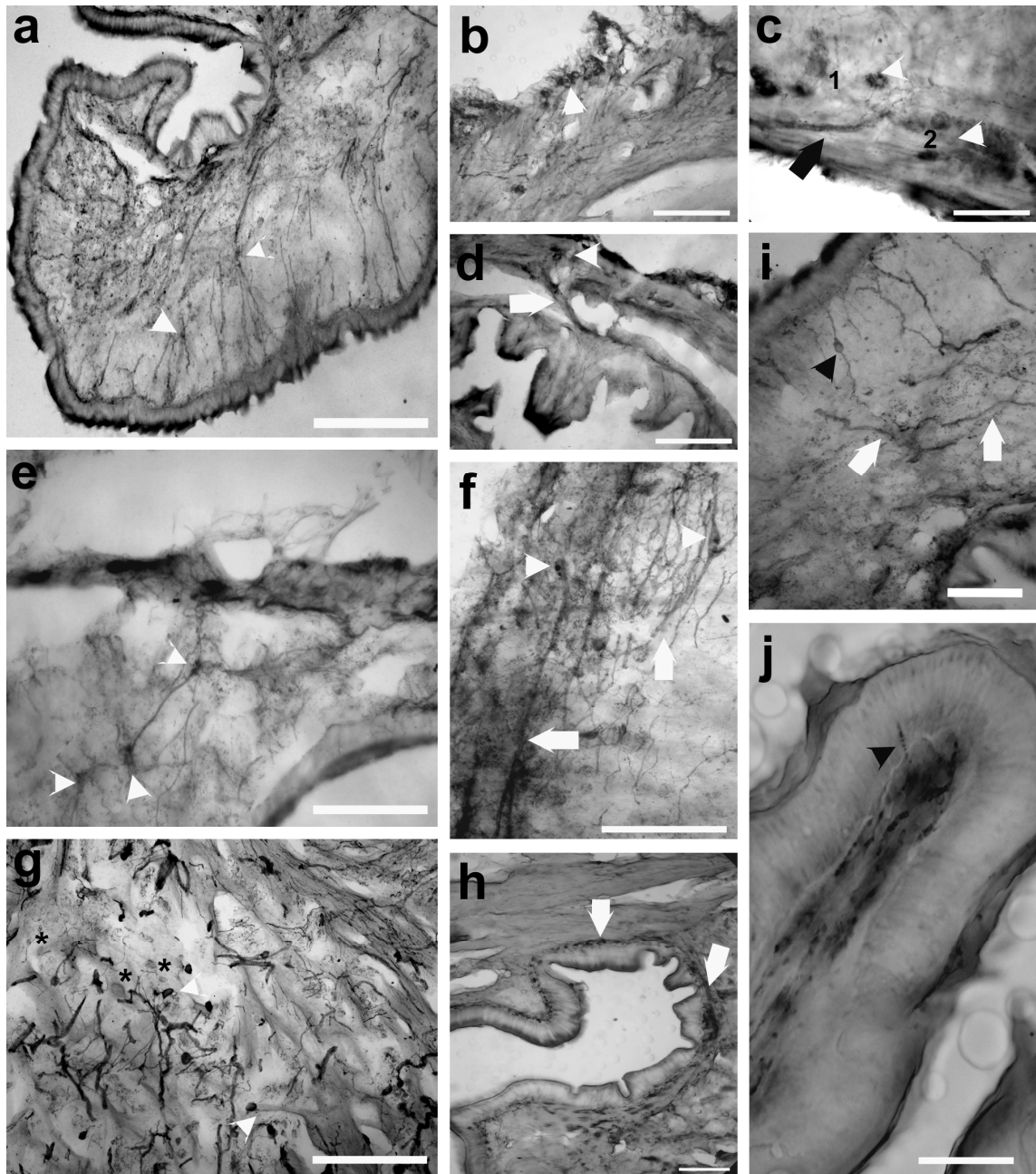


Figure 5

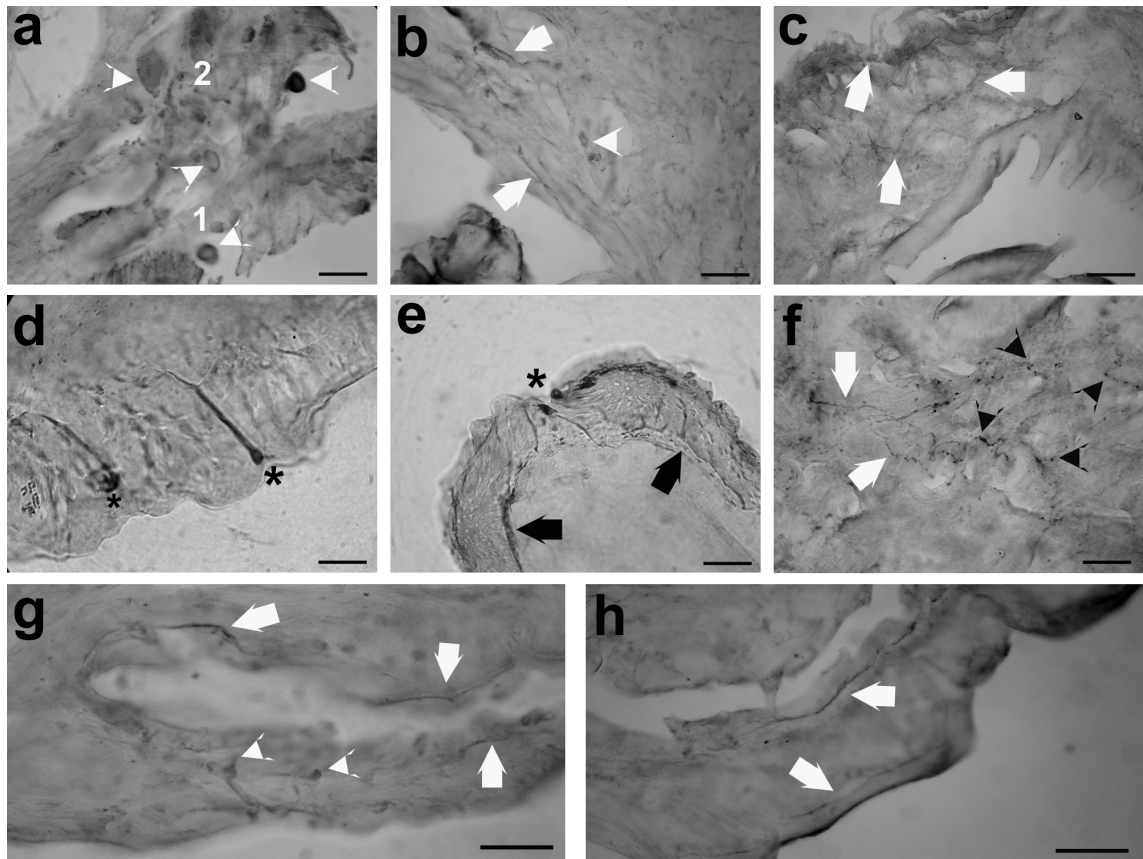
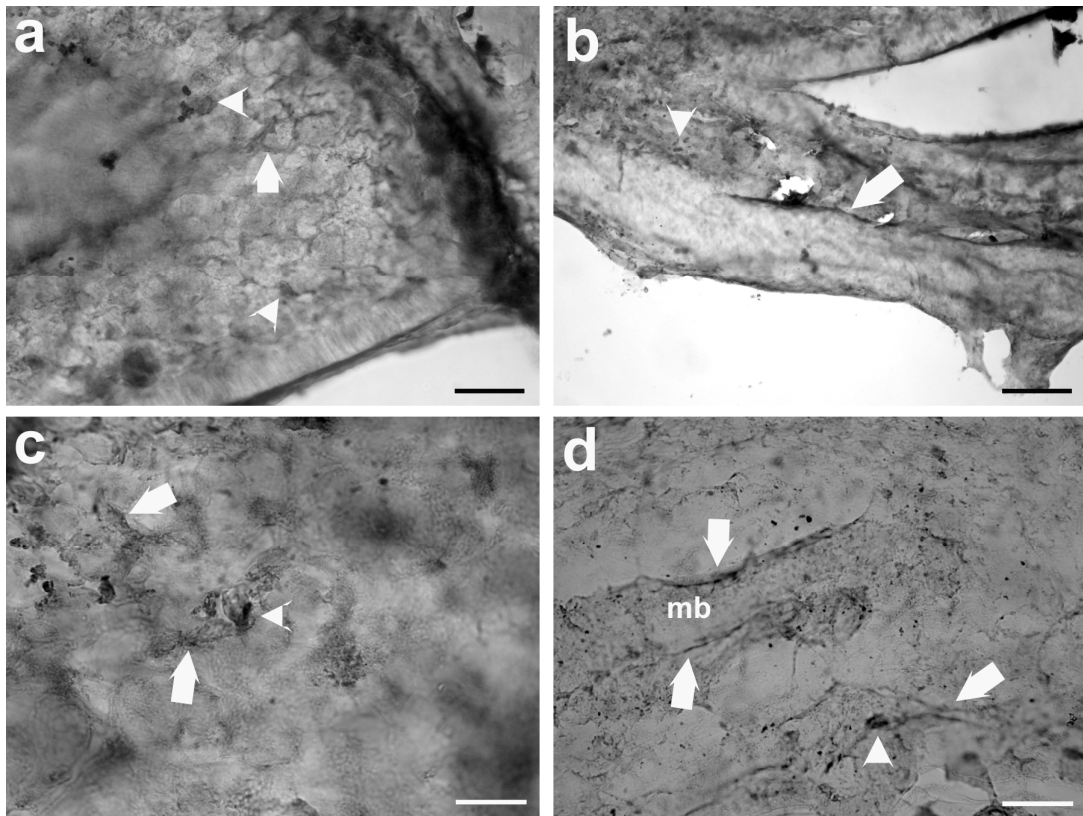


Figure 6



4. DISCUSSÃO

Apesar do tGI em gastrópodes ser considerado de pouco valor taxonômico, sendo descrito como evolutivamente conservado (HASZPRUNAR, 1988), observa-se uma grande variabilidade na sua organização morfológica. Em uma revisão sobre a sistemática de estilomatóforos foram listadas diversas características para determinação das diferentes subclasses, dentre elas: formato do pró-ventrículo (papo-gástrico) e bolsa gástrica e comprimento e circunvoluções do intestino (TILLIER, 1989). No entanto, o tGI nestes animais é considerado o mais simplificado ao longo do processo evolutivo (TILLIER, 1989). Esta variação na organização morfológica reflete a grande gama de repertórios alimentares apresentados por estes animais, gerando divergências na nomenclatura adotada pelos diferentes autores. A terminologia utilizada para a descrição anatômica do tGI em *M. abbreviatus* foi baseada em HYMAN (1967), GRASSÉ (1968), CARRIKER (1946) e TILLIER (1989).

A determinação das regiões do SD em estilomatóforos é baseada em opistobrânquios plesiomórficos e na família Otinidae, principalmente no que se refere à morfologia do papo-gástrico, contiguidade da abertura dos ductos da glândula digestiva e comprimento do intestino (GOSLINER, 1981; TILLIER, 1984, 1989). A porção média do tGI nestes animais é constituída pelo estômago e intestino, enquanto que a posterior é representado pelo reto e ânus (CARRIKER, 1946; HYMAN, 1967; GRASSÉ, 1968). O estômago, em *M. abbreviatus*, é uma dilatação da porção média do tGI, cuja maior parte se encontra envolta pela glândula digestiva. O estômago apresenta um formato de U, podendo ser divisível em duas porções: pró-ventrículo e moela. O formato deste órgão é semelhante ao descrito em *Amphibola* e *Giadina* (HYMAN, 1967), *Phyllocaulis soleiformis* (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990) e *Bradybaena similis* (THOMÉ *et al.*, 1996), no entanto estes autores não se referem à existência de uma porção tubular e outra semi-esférica no órgão. A ampla sintopia do estômago com a glândula digestiva, bem como a disposição dos ductos desta glândula em *M. abbreviatus* é semelhante às de *Strophocheilus lorentzianus* e *B. similis* (SCOTT, 1939; THOMÉ *et al.*, 1996). Subdivisões semelhantes ao observado no estômago de *M. abbreviatus* são descritas em prosobrânquios (FRETTER & GRAHAM, 1962), basomatóforos e estilomatóforos (HYMAN, 1967). Entretanto, em estilomatóforos a moela é descrita como ausente, sendo considerada como um órgão de basomatóforos primitivos (HYMAN, 1967). Na literatura, a primeira

porção do estômago é referida como papo-gástrico (TILLIER, 1989), sendo considerado como parte do esôfago posterior em alguns pulmonados (*Lymnaea stagnalis*, CARRIKER, 1946; *Achatina fulica*, GHOSE, 1963). Contudo, em *M. abbreviatus* quatro características nos permitem denominar esta região como pró-ventrículo: (i) presença de um esfíncter muscular que demarca a sua transição com o esôfago, também descrito no sistelomatóforo *Onchidella celtica* (FRETTER, 1943); (ii) existência de uma constrição em seu diâmetro próximo à moela; (iii) emissão do ducto anterior da glândula digestiva, ambos semelhantes ao caracol *Theba pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988) e (iv) devido a sua característica glandular, similarmente ao descrito para outros pulmonados (MORTON, 1955a; RIGHI, 1964; LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990). A moela, amplamente descrita em basomatóforos, realiza grande trabalho de trituração e mistura (MORTON, 1955b). Em *M. abbreviatus*, assim como em outros pulmonados, constitui uma segunda porção funcional do estômago (FRETTER, 1943, GHOSE, 1963) e não um órgão separado deste como descrito no opistobrânquio *Aplysia punctata* (HOWELLS, 1942). Outras características presentes na moela de opistobrânquios e alguns pulmonados, tais como, divisão em dois compartimentos internos ou bi-lobação, presença de uma papila gástrica, existência de tiflossoles gástricas ou de um ceco-gástrico (CARRIKER & BILSTAD, 1946; MORTON, 1955b; ROACH, 1968; FRETTER & HIAN, 1979; ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988; PENA *et al.*, 2004) não estão presentes em *M. abbreviatus*. Em sistelomatóforos o piloro, porção final do estômago, é descrita como parte do intestino, sendo denominado intestino tiflossolear (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990), entretanto em *M. abbreviatus* identificamos o piloro como parte do estômago, provavelmente desempenhando uma atividade coordenada com a moela, assim como tem sido descrito em diferentes grupos de gastrópodes (SCOTT, 1939; CARRIKER & BILSTAD, 1946; RIGBY, 1962; LUFTY & DEMIAN, 1967).

O estômago é seguido pelo intestino, que se caracteriza por ser longo e espiralado ou enrolado em herbívoros (HYMAN, 1967; TILLER, 1989). O intestino em *M. abbreviatus* apresentou muitas semelhanças ao descrito em *S. lorentzianus* (SCOTT, 1939) e *Helix pomatia* (KÜRKENTHAL *et al.*, 1969). Em *M. abbreviatus*, três regiões são morfologicamente distintas: pró-intestino, médio-intestino e pós-intestino, enquanto que em Limacoidea e Milacidae são observadas quatro porções distintas: tiflossolear, anterior, média e posterior (LEAL-ZANCHET, 1998). O pró-intestino ou intestino tiflossolear apresenta duas tiflossoles de igual comprimento, diferente do descrito em prosobrânquios (LUFTY & DEMIAN, 1967) e

outros pulmonados (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990; DIMITRIADIS, 2001), enquanto que o médio-intestino, semelhante a *T. pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988), não apresentou estas estruturas no seu lúmen como o observado em outros estilomatóforos (DIMITRIADIS, 2001). A presença de ceco, descrita no sistelomatóforo *O. celtica* (FRETTER, 1943), no basomatófora *L. stagnalis* (CARRIKER & BILSTAD, 1946; BOER & KITS, 1990) e em Limacoidea e Milacidae (HYMAN, 1967; LEAL-ZANCHET, 1998), não foi observada em *M. abbreviatus*. As características apresentadas pelo pós-intestino neste estudo não se diferenciaram do observado em outros pulmonados (DIMITRIADIS, 2001). O reto difere do pós-intestino pela diminuição do lúmen, semelhante ao observado nos gastrópodes em geral (HYMAN, 1967). O reto não apresentou cintas longitudinais na sua parede, arranjo descrito em outros gastrópodes terrestres (HYMAN, 1967).

Microscopicamente, também existem muitas diferenças sobre a organização tecidual da parede. O epitélio digestório em *M. abbreviatus* é cilíndrico simples, variando entre intermitente-ciliado e ciliado, sendo possível identificar seis ou mais tipos celulares ao longo desta camada, assim como o descrito para outros pulmonados (PANIAGUA & NISTAL, 1983; LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990; FRANCHINI & OTTAVIANI, 1992; LUCHEL *et al.*, 1997). No entanto, um epitélio cilíndrico intermitente ciliado é característico de animais com um estômago apenas glandular, como *A. fulica* (GHOSE, 1963), *T. pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988), *D. reticulatum* (TRIEBSKORN, 1989) e os do gênero *Helix* (GUARDOBASSI & FERRERI, 1953; DIMITRIADIS *et al.*, 1992), que não é o caso em *M. abbreviatus*. Neste animal o estômago é composto, apresentando um epitélio intermitente ciliado na primeira e intermitente ciliado ou não ciliado recoberto por uma cutícula na segunda porção, como em *P. soleiformis* (LEAL-ZANCHET *et al.*, 1990) e outros gastrópodes (HYMAN, 1967). Em contrapartida, a presença de células ciliadas e o arranjo em microvilosidades na mucosa do tGI são características comuns em pulmonados (LUCHEL *et al.*, 1997). Um estudo ultra-estrutural apontou que o estômago em *M. abbreviatus* apresenta uma mucosa ciliada (FACCIONE-HEUSER *et al.*, 2002), entretanto a presença de cutícula na moela permite inferir que os cílios possam estar presentes apenas no pró-ventrículo. Neste sentido, um estudo ultra-estrutural complementar que analise e compare as porções do estômago, bem como do intestino permitirá descrever a ultra-estrutura da mucosa em *M. abbreviatus*. O aumento no número de células caliciformes a partir do estômago até o reto e ânus é semelhante ao observado em outros pulmonados (CARRIKER & BILSTAD, 1946; GHOSE, 1963; ROLDAN &

GARCIA-CORRALES, 1988). A túnica submucosa em *M. abbreviatus* caracteriza-se por ser uma espessa túnica, constituída por tecido conjuntivo e contendo grande quantidade de espaços vasculares, somas e fibras neuronais. Este dado difere do descrito no opistobrânquio *Aplysia* (ITO & KUROKAWA, 2007), onde os autores consideram que todos os tecidos adjacentes a mucosa constituem a submucosa, incluindo as fibras musculares. A túnica muscular mantém o arranjo em duas camadas, circular interna e longitudinal externa, observado em outros pulmonados (PANIAGUA & NISTAL, 1983; LUCHEL et al., 1997). Entretanto, no reto de *M. abbreviatus*, a túnica muscular torna-se mais delgada, quando comparada à localizada no pós-intestino, devido à ausência da camada muscular longitudinal; resultado também observado em estilomatóforos da família Veronicellidae (HOFFMANN, 1925).

Como anteriormente referido, o estômago em *M. abbreviatus* apresenta duas regiões histológicas distintas: glandular (representado pelo pró-ventrículo) e muscular (representado pela moela), similarmente ao observado nos pulmonados *Leucophytia* (MORTON, 1955a) e *Phyllocaulis* (LEAL-ZANCHET et al., 1990) e no neogastrópode *Thais haemastoma* (RIGHI, 1964). O pró-ventrículo é histologicamente semelhante ao estômago glandular ou simples observado em *A. fulica* (GHOSE, 1963), *T. pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988), *D. reticulatum* (TRIEBSKORN, 1989) e *Helix* (GUARDOBASSI & FERRERI, 1953; DIMITRIADIS et al., 1992). A principal característica da moela é a presença de três camadas musculares, que se dispõem circular, oblíqua e longitudinalmente, semelhante ao descrito no basomatóforo *Lymnaea* (CARRIKER & BILSTAD, 1946) e no estilomatóforo *T. pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988). Não encontramos o arranjo intercalar entre a circular e longitudinal que resulta na presença de quatro camadas, descrito no estilomatóforo *A. fulica* (GHOSE, 1963). O arranjo da túnica muscular em três camadas torna a parede da moela muito espessa em todo o órgão e não somente nas regiões de curvatura e de emissão dos ductos da glândula digestiva, como o observado no estilomatóforo *Strophocheilus miersi* (PENA et al., 2004). Enquanto que no intestino, a túnica muscular apresenta-se contínua, com predomínio da camada circular sobre a longitudinal, similar ao descrito em outros pulmonados (LUCHEL et al., 1997). Neste estudo não observamos a formação de bandas de fibras musculares na parede do intestino, tal qual descrito no basomatófora *Otina otis* (MORTON, 1955b) e no estilomatófora *A. fulica* (GHOSE, 1963). Porém, no pró-intestino a presença das tiflossoles faz com que surjam duas cintas de fibras musculares longitudinais, organização presente na

mesma porção do intestino dos pulmonados *A. fulica* (GHOSE, 1963) e *T. pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988) e do opistobrânquia *A. punctata* (HOWELLS, 1942). Já no reto de *M. abbreviatus*, conforme anteriormente abordado, a túnica muscular se apresenta mais delgada e não forma cintas longitudinais, diferenciando-se das descrições em outros pulmonados (CARRIKER & BILSTAD, 1946; MORTON, 1955b; GHOSE, 1963), entretanto a predominância da camada muscular circular é semelhante aos pulmonados *Lymnaea* (CARRIKER & BILSTAD, 1946), *A. fulica* (GHOSE, 1963) e *T. pisana* (ROLDAN & GARCIA-CORRALES, 1988) e ao opistobrânquio *A. punctata* (HOWELLS, 1942).

Com relação à inervação do trato intestinal, com especial atenção ao intestino médio, a literatura reporta diferentes situações para a origem e distribuição dos nervos, gerando uma descrição controversa. No estilomatóforo *Helix pomatia* (SCHMALZ, 1914; BANG, 1916) e no opistobrânquia *Aplysia* (SCHWARZ & SUSWEIN, 1984, 1986) a inervação do estômago origina-se nos gânglios bucais, que emitem o nervo gástrico anterior e posterior, enquanto que no estilomatófora *A. fulica* estes gânglios emitem os nervos comuns do papo (ABEYSEKERA & BRECKENRIDGE, 1979). Já a inervação do intestino tem origem no nervo intestinal emitido pelo gânglio visceral (SCHMALZ, 1914; GHOSE, 1962; ELEKES *et al.*, 1985; KRUATRACHUE *et al.*, 1993; ANTKOWIAK & CHASE, 2003). Também é descrito nos estilomatóforas *Arion ater* (ROACH, 1968) e *A. fulica* (ABEYSEKERA & BRECKENRIDGE, 1979) que os nervos gástricos constituem um plexo nervoso ganglionar sobre a parede dorsal do estômago. Em *M. abbreviatus*, a participação dos nervos gástricos na formação de um plexo ganglionar estomacal será considerada mais adiante. Contudo, podemos afirmar que a inervação do intestino médio e posterior tem origem no gânglio visceral, assim como o relatado em outros pulmonados (SCOTT, 1939; NISBET, 1961; GHOSE, 1962; BAGUST *et al.*, 1979; ELEKES *et al.*, 1985; KRUATRACHUE *et al.*, 1993; ANTKOWIAK & CHASE, 2003). Apesar desta semelhança na origem da inervação, é importante salientar que encontramos uma variação quanto ao número de nervos que se originam do gânglio visceral. Na literatura são descritos que dois a seis nervos são emitidos pelo gânglio visceral em pulmonados (SCHMALZ, 1914; BANG, 1916; SCOTT, 1939; NISBET, 1961; GHOSE, 1962; COOK, 1966; ABEYSEKERA & BRECKENRIDGE, 1979; KRUATRACHUE *et al.*, 1993). Porém, ressaltamos que em *M. abbreviatus* o gânglio visceral emite cinco nervos: aórtico, columelar, palial-posterior, nV e nR.

Sobre a inervação do intestino médio em *M. abbreviatus* o segundo aspecto a ser discutido é a nomenclatura. Nos estilomatóforas *Helix* (SCHMALZ, 1914; BAGUST *et al.*, 1979; ELEKES *et al.*, 1985), *Succinea putris* (COOK, 1966) e *A. fulica* (ABEYSEKERA & BRECKENRIDGE, 1979) é descrito que o nervo intestinal emerge da margem dorso-posterior do gânglio visceral, como um grosso feixe nervoso, inervando o coração, rim, glândula digestiva, parte dos órgãos sexuais, tegumento, além do estômago e intestino (BULLOCK & HORRIDGE, 1965). A complexidade da inervação remetida por este nervo, descrita tanto em opistobrânquios (*Elysia*, *Aeolidia* e *Fiona*, RUSSEL, 1929) quanto em pulmonados (*S. lorentzianus*, SCOTT, 1939; *Archachatina*, NISBET, 1961; *A. fulica*, GHOSE, 1962) fez com que Scott (1939) e Hyman (1967) o denominassem nervo visceral comum (nV). Assim, em *M. abbreviatus* utilizamos a nomenclatura nV, por concordarmos com estes autores que esta denominação reflete mais a complexidade da inervação oriunda deste nervo.

O terceiro aspecto, da inervação do intestino médio, a ser discutido é o padrão da inervação e da ramificação do nV. Conforme anteriormente abordado, alguns autores afirmam que o estômago é inervado a partir dos gânglios bucais por um nervo comum ao esôfago e ao estômago (SCHMALZ, 1914; BANG, 1916; ABEYSEKERA & BRECKENRIDGE, 1979; SCHWARZ & SUSWEIN, 1984, 1986). Porém, observamos em *M. abbreviatus* que o estômago e o intestino possuem uma inervação comum por meio do ramo gastrointestinal (rG) originado do nV e que este ramo não emerge diretamente do gânglio visceral como foi descrito em *S. putris* (COOK, 1966). Achamos pertinente denominá-lo rG por acreditarmos que a denominação intestinal (GHOSE, 1962; ELEKES *et al.*, 1985; KRUIATRACHUE *et al.*, 1993; ANTKOWIAK & CHASE, 2003) possa remeter erroneamente à descrição de Schmalz (1914). Assim como o observado em *A. fulica* (GHOSE, 1962), em *M. abbreviatus* o rG emite vários ramos que se distribuem sobre a parede do estômago e intestino. Ainda, os ramos gástricos realizam conexão com um gânglio na parede dorsal do estômago, semelhante ao descrito em *A. ater* (ROACH, 1968). Não observamos o nV emitindo os ramos cardio-intestinal descrito no sistelomatóforo *Vaginula solea* (COIFMANN, 1934) e em *H. aspersa* (BAGUST *et al.*, 1979) ou reno-intestinal observado em *H. pomatia* (ELEKES *et al.*, 1985). Um dado interessante é que para *H. pomatia*, *Aplysia oculifera* e *A. fasciata* foram descritas a presença de corpos de neurônios ao longo do nervo, podendo estar isolados ou formando grupos (ELEKES *et al.*, 1985, SCHWARZ; SUSWEIN, 1984, 1986), o que não foi visualizado em *M. abbreviatus*. Em relação à inervação do intestino posterior (reto e ânus), não

encontramos divergências entre nossas observações e o descrito na literatura. Contudo, consideramos prudente denominar o nervo como reto-anal (nR) e não somente anal (SCHMALZ, 1914; BANG, 1916; SCOTT, 1939; BULLOCK & HORRIDGE, 1965; HYMAN, 1967; ABEYESEKERA & BRECKENRIDGE, 1979; KRUAETRACHUE *et al.*, 1993), por este inervar tanto o reto quanto o ânus.

Invertebrados superiores, incluindo anelídeos (BARNA *et al.*, 2001; IERUSALINSKY & BALABAN, 2006) e artrópodes (ROBERTS, 1997; HARTENSTEIN, 1997; AYALI, 2004; KATZ, 2007) apresentam o SNEG, um sistema de gânglios periféricos e fibras nervosas que inervam vísceras e controlam a ingestão de alimentos, recaptação e transporte de nutrientes, respiração e excreção. Suas funções são comparáveis às atribuídas ao sistema nervoso autônomo (SNA) de vertebrados, controlando os músculos bucais e regulando intestino anterior e médio (HARTENSTEIN, 1997; AYALI, 2004; KATZ, 2007). Em gastrópodes, o SNEG foi inicialmente descrito como dois gânglios localizados na transição entre a massa bucal e o esôfago, conectados ao SNC e que inervam o tGI por meio dos nervos esofageais (LACAZE-DUTHIERS, 1898; PARAVICINI, 1898, ALEXANDROWICZ, 1912; RUSSEL 1929; STEFANELLI, 1932ab, 1934ab). Estes gânglios, em pulmonados, seriam constituídos por um pequeno número de neurônios (LACAZE-DUTHIERS, 1898; PARAVICINI, 1898), não sendo citados quantos neurônios foram encontrados. Ainda, durante certo período o termo SNEG foi aplicado aos gânglios bucais, por se acreditar que esta estrutura pertencia a este gânglio (LACAZE-DUTHIERS, 1898; RUSSEL, 1929). Entretanto, no opistobrânquio *Aplysia* o SNEG constitui-se por um anel nervoso, disposto entre o papo e a moela (FUJISAWA *et al.*, 1999; FURUKAWA *et al.*, 2001; MORISHITA *et al.*, 2003; ITO & KUROKAWA, 2002, 2007). Este anel estomatogástrico apresenta neurônios formando cadeias ou pequenos grupos que recebem aferências dos gânglios bucais por intermédio do nervo esofageal (FUJISAWA *et al.*, 1999). Já no estilomatóforo *A. ater* os ramos gástricos conectam-se diretamente a um gânglio gástrico (ROACH, 1968). Porém, o SNEG em *M. abbreviatus* apresenta três características que o diferenciam destas descrições: (i) ser constituído por quatro gânglios (estomatogástrico, gástrico, pilórico e cárdico) interconectados por uma série de nervos; (ii) os cerca de 30 neurônios estão distribuídos entre os gânglios localizados sobre a parede do estômago; (iii) a maior aferência do SNC para o tGI ocorre por meio do rG que conecta-se ao gânglio estomatogástrico, conforme verificado por meio da marcação anterógrada com LY, apesar de não identificarmos a conexão entre o SNEG com os nervos esofageais diretamente. A

complexidade na organização do SNEG em *M. abbreviatus*, nos leva a concordar com Paravivini (1898) que este constitui um análogo ao sistema nervoso simpático (SNS) dos vertebrados. A localização dos gânglios na moela (estomatogástrico), nas transições esôfago-pró-ventricular (cárdico), do pró-ventrículo com a moela (gástrico) e gastro-pilórica (pilórico) assemelha-se mais a organização descrita para crustáceos (MULLONEY & SELVERSTON, 1974; MULLONEY, 1987; ROBERTS, 1997) do que a encontrada em *Aplysia* (FUJISAWA *et al.*, 1999) ou em anelídeos (BARNA *et al.*, 2001; IERUSALINSKY & BALABAN, 2006). Além disso, o papel do SNEG no controle do fluxo de alimentos em gastrópodes vem sendo amplamente estudado (KUPFERMANN & WEISS, 2001; ITO & KUROKAWA, 2007). Novas abordagens, como eletrofisiologia e neuroquímica, podem representar um importante passo para o entendimento do real controle exercido pelo SNEG no funcionamento do tGI nos gastrópodes.

Relativo aos circuitos neurais centrais que controlam o comportamento alimentar de gastrópodes, muitos estudos estabeleceram os programas motores envolvidos nas fases de retração e protração da rádula (CHASE, 2002; ELLIOTT & SUSSWEIN, 2002; CROPPER *et al.*, 2004). O complexo ganglionar parieto-visceral (gânglios parietais e visceral) inerva o intestino médio, órgãos reprodutivos, pneumóstomo, cavidade renopericardial e manto (DORSETT, 1986). No opistobrânquia *Aplysia* estudos demonstraram que efetores visceromotores controlados pelos gânglios abdominal (DIERINGER *et al.*, 1978; KOCH *et al.*, 1984) e pedal-pleural (XIN *et al.*, 1996) exercem importante papel na coordenação do comportamento alimentar, inibindo as fases apetitivas e consumatórias. Entretanto, as investigações abordando o controle do SNC via nV sobre as atividades viscerais revelam abordagens relativas ao funcionamento dos sistemas cárdio-renal, respiratório e órgãos reprodutivos (*H. pomatia*, PIN & GOLA, 1984; VEHOVSZKY & ELEKES, 1985; RÓZSA, 1987; *H. aspersa*, KERKUT *et al.*, 1975; BAGUST *et al.*, 1979; ANTKOWIAK & CHASE, 2003; CHASE *et al.*, 2004; *L. stagnalis*, HAQUE *et al.*, 2006). A participação do Vn e nR sobre o controle do intestino médio e posterior, bem como a localização destes neurônios nos gânglios centrais não tem recebido atenção em gastrópodes pulmonados. Este fato dificulta uma comparação precisa sobre o controle exercido pelo SNC no funcionamento destas porções do tGI entre as diferentes espécies de gastrópodes.

Em *M. abbreviatus*, a maioria dos neurônios marcados que formam o rG localizam-se nos gânglios parietal direito (Pad), gânglio visceral (V) e pedal direito (Pd). Outros gânglios

com uma quantidade importante de neurônios marcados são o pleural direito (Pld) e o pedal esquerdo (Pe). De forma similar, no nR a maioria dos neurônios marcados estão localizados no Pad e V, porém o Pe apresenta o terceiro maior número de neurônios, sendo seguido pelo Pd. Nos estilomatóforos *Helix* (BAGUST *et al.*, 1979; VEHOVSZKY and ELEKES, 1985; RÓZSA, 1987) e *A. fulica* (KRUATRACHUE *et al.*, 1993) o controle das funções viscerais é mediado pelos neurônios do complexo parieto-visceral, semelhante ao observado em *M. abbreviatus*, principalmente se considerarmos que 55% dos neurônios marcados no rG e 59.28% no nR estão localizados nestes gânglios.

A localização de alguns neurônios marcados no rG e no nR permite tentarmos propor alguma correlação entre neurônios do complexo subesofageal em *H. pomatia* e *H. aspersa* (PARMENTIER, 1973; KERKUT *et al.*, 1975; RÓZSA, 1987; JANAHMADI *et al.*, 1999), *Lymnaea* (WINLOW & BENJAMIN, 1976; HAYDON & WINLOW, 1981; SLADE *et al.*, 1981; MAGOSKI & BULLOCH, 1998) e *A. fulica* (SANTOS *et al.*, 1992) e os retrogradamente marcados em *M. abbreviatus*. Por exemplo, no gânglio visceral de *M. abbreviatus*, os neurônios localizados nas suas margens anterior e posterior-esquerda parecem ter posição similar a dos neurônios V1 a V5 de *Helix* (PARMENTIER, 1973; KERKUT *et al.*, 1975; RÓZSA, 1987) e VD2 e VD3 de *Lymnaea* (MAGOSKI & BULLOCH, 1998). É possível observar algumas similaridades entre neurônios grandes retrogradamente marcados dos gânglios visceral e gânglio parietal direito de *M. abbreviatus* com alguns neurônios já identificados, como o V21 e RPA1 dos gânglios visceral e parietal direito de *H. pomatia* (ELEKES *et al.* 1985) e E13, E10 (viscerais) e F1 e F76 (parietal direito) de *H. aspersa* (KERKUT *et al.*, 1975; JANAHMADI *et al.*, 1999). Estes neurônios enviam um axônio pelo nervo intestinal ou nV. É importante salientar que as correlações realizadas baseiam-se apenas em critérios anatômicos e que Campbell & Hodos (1970) listam nove tipos de dados utilizados no estabelecimento de homologias em neurônios do SNC. Conhecimentos neuroquímicos e eletrofisiológicos destes prováveis neurônios efetores do SD são necessários para ser possível correlações com o sistema nervoso de outros gastrópodes pulmonados. Não foram encontradas referências específicas sobre a marcação retrógrada do rG, mas sabe-se que alguns neurônios viscerais e parietais cardiorreguladores podem enviar axônios também pelo ramo que inerva a parede do intestino médio, o que explicaria por que alguns neurônios viscerais e parietais retromarcados de *M. abbreviatus* coincidem com neurônios identificados de *H. pomatia* (VEHOVSKY & ELEKES, 1985).

É importante esclarecer que como os métodos de marcação utilizados não devem ser transinápticos, os neurônios considerados consistentemente marcados são apenas os envolvidos primariamente neste controle. E como também marcaram projeções aferentes que terminaram em extensas ramificações neuríticas nos neuropilos, o rG e o nR também possuem muitas fibras sensoriais. Ainda que os somas marcados nos gânglios centrais possam ser tanto motores como aferentes de segunda ordem, a comparação com neurônios centrais em outros gastrópodes pulmonados estudados pode permitir alguma especulação.

Pode-se estabelecer, entretanto, algumas correlações com os neurônios tanto dos gânglios pedais como do gânglio visceral, retrogradamente marcados pelo rG e nR, utilizando o mapeamento neuroquímico já realizado nesta espécie. O grupo de neurônios encontrados junto à margem posterior do gânglio visceral, retrogradamente marcados do rG e nR de *M. abbreviatus*, coincide com o grupo de neurônios identificados como serotoninérgicos nesta espécie (ZANCAN *et al.*, 1997). A distribuição de 5HT sobre e no plexo intramural do trato digestório de *M. abbreviatus* será considerada posteriormente. O par de neurônios gigantes anteriores identificados como serotoninérgicos em *M. abbreviatus* (ZANCAN *et al.*, 1997; SWAROWSKY *et al.*, 2005) também foram retrogradamente marcados pelo rG. Estes neurônios já vinham sendo propostos como moduladores da locomoção, mas como este par de neurônios foi consistentemente retromarcado do rG, resta tentar entender o significado da provável multifuncionalidade destes neurônios. A concomitante inervação pelo rG e nR por parte de um considerável número de neurônios marcados retrogradamente pelos dois nervos de forma simultânea são outros exemplos, ainda que em escala menor, desta multifuncionalidade dos neurônios do SNC dos moluscos.

A arquitetura do SNE em estilomatóforos relembra a encontrada em vertebrados (RÖSZER *et al.*, 2004). O SNE de *M. abbreviatus* é constituído por duas redes neuronais paralelas, o PS e o PM, que percorrem o tGI desde o esôfago até o ânus, sendo esta arquitetura idêntica a descrita em outros gastrópodes (LACAZE-DUTHIERS, 1898; PARAVICINI, 1898, ALEXANDROWICZ, 1912; RUSSEL, 1929; STEFANELLI, 1932ab; 1934ab, ÁBRAHÁM, 1940; JABONERO & RODRIGO, 1966). Contudo, Ito & Kurokawa (2007) consideram o SNEG como um componente do SNE no opistobrânquio *Aplysia*, o que nos leva a discordar com base em argumentos anteriormente expostos. A maior concentração de neurônios na junção esôfago-gástrica observada em *M. abbreviatus* também é observada em outros gastrópodes (*A. ater*, ROACH, 1968; *Amphibola crenata*, PILKINGTON, 1981, 1982;

Aplysia, ITO & KUOKAWA, 2007), sugerindo um controle do fluxo de alimentos por meio do cárdia, visto que o papo em estilomatóforos atua como um órgão de estocagem. Ainda, a diminuição no número de somas na moela de *M. abbreviatus* ocorra devido ao espessamento da parede neste órgão ou a presença do SNEG que suprime a necessidade de um maior número de neurônios no PS e PM. Entretanto, em *M. abbreviatus* é importante salientar que o PM apresenta maior número de somas que o PS, mas que neurônios estão presentes na submucosa, diferente do descrito em *Aplysia* (ITO & KUOKAWA, 2007). Os tipos neuronais presentes no PS e PM de *M. abbreviatus* são unipolares e multipolares, raramente sendo visualizados neurônios bipolares, constituindo morfologias neuronais amplamente descritas em gastrópodes (STEFANELLI, 1932ab, 1934ab; ÁBRAHÂM, 1940; JABONERO & RODRIGO, 1966). A presença de células nervosas intra-epiteliais (*neuron-like intraepithelial cells*) dispostas esparsadamente entre as células epiteliais da mucosa, é semelhante ao descrito por Zaitseva (2006) no tGI dos prosobrânquios *Littorina littorea*, *Cryptonatica clausa* e *Buccinum undatum*, dos opistobrânquios *Dendronotus arborescens* e *Coryphella rufibranchialis* e dos pulmonados *A. fulica*, *H. pomatia* e *D. reticulatum*. A existência de células fusioformes, presentes no SNE de *M. abbreviatus* não é referida na literatura para gastrópodes. Entretanto, dada a sua semelhança morfológica e devido a sua localização podemos especular que talvez elas representem indícios do aparecimento das células intersticiais de Cajal no tGI de invertebrados. No entanto, a natureza química destes minineurônios, assim como das células nervosas intra-epiteliais ainda precisam ser melhor investigadas em *M. abbreviatus*.

Estudos neuroquímicos anteriores e outros mais recentes apontam para presença de várias moléculas sinalizadoras atuando na modulação e controle das atividades no SNC e SNP de gastrópodes (ELEKES *et al.*, 1994; GIARDINO *et al.*, 1996; MOROZ & GILLETTE, 1996; FUJISAWA *et al.*, 1999; FURUKAWA *et al.*, 2001; MORISHITA *et al.*, 2003; RÖSZER *et al.*, 2006). Como referido anteriormente, a neuroquímica tanto no SNC como no SNP de *M. abbreviatus* vem sendo investigada (ZANCAN *et al.*, 1994; ZANCAN *et al.*, 1996; ZANCAN *et al.*, 1997; RIGON *et al.*, 1998; MORIGUCHI-JECKEL, 2001; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004; SWAROWSKI *et al.*, 2005; RIGON *et al.*, 2009, 2010). Contudo, no presente estudo, foi demonstrado que o intestino médio e posterior de *M. abbreviatus* é ricamente innervado por elementos neurais contendo as substâncias investigadas.

Como anteriormente referido, o tGI em *M. abbreviatus* recebe inervação central principalmente do complexo ganglionar parieto-visceral. De acordo com nossas observações, fibras nervosas identificadas com os anticorpos ou processos enzimáticos utilizados penetram a parede do estômago, intestino e reto e distribuem-se entre as túnicas submucosa e muscular, inervando os feixes nervosos ali existentes. Assim como em *Helix* (S-Rózsa *et al.*, 1986; Hernádi *et al.*, 1989), o nV e o nR apresentam fibras serotoninérgicas oriundas do SNC (dado discutido anteriormente). Outros marcadores químicos investigados em *M. abbreviatus* também indicam semelhança com estudos que investigaram o código químico anteriormente. Neurônios com atividade colinesterásica (ZANCAN *et al.*, 1994) localizados na porção anterior dos gânglios visceral e parietal direito demonstram semelhança aos retrogradamente marcados tanto no nV como no nR. Mesmo que a atividade da AChE não constitui um critério satisfatório para determinar a natureza colinérgica destes neurônios, não pode ser descartada a possibilidade destes neurônios serem colinérgicos. No mesmo sentido, o expressivo número de neurônios FMRFa-ir situados nos gânglios visceral e parietais de *M. abbreviatus* (Moriguchi-Jeckel, 2001), parecem ser homólogos aos retrogradamente marcados no nV e nR, o que permite conjecturar que este peptídeo participa do controle das funções do tGI nesta espécie. Recentemente, RIGON *et al.* (2009) identificaram os neurônios com atividade NADPHd no SNC de *M. abbreviatus*. À semelhança dos demais marcadores, os somas NADPHd-positivos situados no complexo viscero-parietal parecem coincidir com alguns dos somas retrogradamente marcados no nV e no nR. Inervação com atividade diaforásica no tGI tem sido reconhecida em outros gastrópodes. Por exemplo, em *Pleurobranchia* os axônios em nervos periféricos demonstram possuir atividade NADPHd, principalmente nos nervos estomatogástricos, e no SNC dois neurônios do gânglio visceral (V1 e V2) mostraram uma menor intensidade na atividade da NADPHd (MOROZ & GILLETTE, 1996). A presença desta atividade enzimática indica o possível envolvimento do NO, mesmo que indiretamente, no controle central das atividades do tGI em *M. abbreviatus*, semelhante ao observado no controle central do comportamento alimentar de gastrópodes (SADAMOTO *et al.*, 1998; MOROZ, 2000; ELLIOTT & SUSSWEIN, 2002), atuando em conjunto com outros neurotransmissores.

Assim como a morfologia, a neuroquímica do SNEG em gastrópodes é pouco conhecida. No opistobrânquio *Aplysia* são descritos neurônios e fibras nervosas

imunorreativos ao SCP (LLOYD *et al.*, 1988), ao *Mytilus inhibitory peptide* (FUJISAWA *et al.*, 1999), ao peptídeo cárdio-excitatório NdWFamide (MORISHITA *et al.*, 2003) e fibras nervosas imunorreativas para enterinas (FURUKAWA *et al.*, 2001). No entanto, é importante lembrar que para estes autores o SNEG constitui um dos componentes do SNE, o que nos leva a especular que seu código químico seja o mesmo no SNEG e no SNE. Isto serve para explicar a presença de neurônios e fibras colinesterásicas, monoaminérgicas, peptidérgicas e NADPHd-reativas observadas no SNEG de *M. abbreviatus*. Até o presente, o código químico do SNEG pode ser discutido por meio da analogia com outros invertebrados em que este sistema encontra-se bem estabelecido (KLEMM *et al.*, 1986; SELVERSTON & MOULINS, 1987; MEYRAND & MARDER, 1991; SWENSEN *et al.*, 2000; BARNÁ *et al.*, 2001; SKIEBE, 2001; IERUSALIMSKY & BALABAN, 2006, KATZ, 2007). Assim, em alguns crustáceos decápodes muitos motoneurônios estomatogástricos liberam ACh, tanto na junção neuromuscular como em conexões intraganglionares (TAZAKI & SAKAI, 1998). Porém, a 5HT parece ter maior importância na transmissão estomatogástrica em outros crustáceos (KUSHNER & BARKER, 1983; MULLONEY & HALL, 1990; TIERNEY *et al.*, 1997; SKIEBE *et al.*, 1999), insetos (KLEMM *et al.*, 1986) e nos anelídeos (BARNÁ *et al.*, 2001).

O código químico do SNE em gastrópodes mostra-se extremamente variado, apresentando atividade de diferentes moduladores (HERNÁDI *et al.*, 1998; OKAMOTO *et al.*, 2007). Apesar da importância da ACh na inervação entérica, seus efeitos fisiológicos e farmacológicos sobre o funcionamento do tGI (BAUX & TAUC, 1983; LLOYD & CHURCH, 1994; PERRY *et al.*, 1998; ROSZER *et al.*, 2009) são mais descritos do que a morfologia dos elementos nervosos em gastrópodes. Considerando que parte da atividade colinesterásica encontrada indique, de fato, a presença de neurônios colinérgicos no plexo entérico e que estes estão distribuídos junto a fibras e neurônios NADPHd-reativos, isto permite especular que esta seria a evidência morfológica para a relação funcional proposta entre o sistema colinérgico e nitrérgico, descrito em *H. pomatia*, de que a ACh exerce controle inibitório sobre a síntese de NO no plexo mioentérico (ROSZER *et al.*, 2009).

A técnica mais utilizada no estudo da morfologia do SNE é a NADPHd, por realizar a clara identificação de neurônios e fibras nervosas em vertebrados (YONG *et al.*, 1993) e invertebrados (ELPHICK & MELARANGE, 2001; AONUMA, 2002; RÖSZER *et al.*, 2004a, 2005; SERFÖZÖ *et al.*, 2008). Em gastrópodes, esta técnica revelou a presença de uma ampla inervação submucosa e mientérica e em nervos extrínsecos nos segmentos médios do tubo

digestório de membros das famílias Helicacea, Succineacea e Vertiliginacea (RÖSZER *et al.*, 2004a). Em *M. abbreviatus*, foi observada que a rede nervosa presente no tGI é tão complexa quanto à descrita em *Helix* (HALASY *et al.*, 1988; RÖSZER *et al.*, 2004a), *A. fulica* e *L. littorea* (ZAITSEVA & KUZNETSOVA, 2008; ZAITSEVA & MARKOSOVA, 2008; ZAITSEVA *et al.*, 2009). Neurônios NADPHd-positivos mostram-se presentes em diferentes porções do tGI de *Helix*, organizados em microgânglios ou isoladamente, assim como o observado em *M. abbreviatus*. No entanto, as diferentes metodologias aplicadas também revelam uma pobre inervação NADPHd-positiva, por exemplo, no ceco de *Helix* (SERFÖZÖ *et al.*, 2008), bem como divergências quanto a presença de elementos NADPHd-positivos em *A. fulica*, visto que RÖSZER *et al.* (2004a) não detectaram atividade desta enzima, enquanto que os estudos realizados por Zaitseva descrevem uma rica inervação NADPHd positiva, constituída por neurônios, feixes de fibras nervosas e receptores intraepiteliais (ZAITSEVA & KUZNETSOVA, 2008; ZAITSEVA & MARKOSOVA, 2008; ZAITSEVA *et al.*, 2009). Em um estudo comparativo entre as famílias Helicacea, Succineacea, Vertiliginacea, assim como observado em *M. abbreviatus*, revelou que existe uma variação entre a morfologia neuronal e na coloração das fibras da rede nervosa entérica NADPHd-positiva nos diferentes órgãos (RÖSZER *et al.*, 2004a). A predominância de neurônios unipolares, seguido dos multipolares e poucos bipolares NADPHd-positivos observados em *M. abbreviatus* corresponde ao descrito em *Helix* (HALASY *et al.*, 1988; RÖSZER *et al.*, 2004a; SERFÖZÖ *et al.*, 2008), *A. fulica* e *Littorina littorea* (ZAITSEVA & KUZNETSOVA, 2008; ZAITSEVA & MARKOSOVA, 2008; ZAITSEVA *et al.*, 2009).

Os neurônios FMRFa-ir estão mais presentes próximos à mucosa e são, em sua maioria, bipolares. Suas muitas fibras com varicosidades formam uma ampla rede junto a esta camada do tGI denotando uma função sensorial para este peptídeo (HERNÁDI *et al.*, 1998). Nas túnicas submucosa e muscular os neurônios encontram-se distribuídos entre as fibras nervosas e os constituintes de cada camada, no entanto um grande número de fibras parece originar-se a partir do SNEG, principalmente as que atingem a mucosa. Contudo, em *Helix* a inervação FMRFa-ir está mais presente na mucosa e submucosa (ELEKES & UDE, 1994; HERNÁDI *et al.*, 1998). Em nossos resultados, principalmente no SNEG e em algumas porções do SNE, mais no PS do que no PM, parece haver uma correlação direta entre a inervação FMRFa e a NADPHd, que pode ser explicada pelo estudo de Röszer *et al.* (2004b), que demonstrou que este peptídeo é utilizado como substrato para a síntese e na liberação

de NO por neurônios entéricos em gastrópodes. Entretanto, este comentário é meramente especulativo, sendo necessário um estudo por microscopia confocal para confirmar esta relação em *M. abbreviatus*.

A 5HT está amplamente envolvida no comportamento alimentar, controlando e modulando as atividades da porção anterior do SD de gastrópodes (*Lymnaea*: McCROHAN & BENJAMIN, 1980ab; YEOMAN *et al.*, 1994ab, 1996; *Aplysia*: KUPFERMANN, 1997; *Achatina*: YOSHIDA & KOBAYASHI, 1991; *Helix*: BERNOCCHI *et al.*, 1998; *Pleurobranchaea*: GILLETTE & DAVIS, 1977; MOROZ *et al.*, 1997; SUDLOW *et al.*, 1998). Na maioria dos invertebrados, principalmente em insetos (KLEMM *et al.*, 1986) e gastrópodes (ELEKES & UDE, 1994; HERNÁDI *et al.*, 1998), a inervação serotoninérgica do tGI possui origem extrínseca. Contudo, em *M. abbreviatus* assim como na minhoca (BARNÁ *et al.*, 2001) está presente uma inervação intrínseca ao trato digestivo. Por estar amplamente envolvida no controle do tGI, este transmissor apresenta grande relação com outros neurotransmissores entéricos. Em *Helix*, tanto 5HT como FMRFa estão presentes na mucosa e submucosa (ELEKES & UDE, 1994; HERNÁDI *et al.*, 1998), porém em *M. abbreviatus* as células 5HT-ir estão somente na submucosa, enquanto que os neurônios FMRFa-ir distribuem-se em todas as camadas. Além disso, em *M. abbreviatus* um número maior de neurônios e fibras nervosas serotoninérgicas são observadas na submucosa do reto e pós-intestino do que no restante do intestino médio. Outra correlação é encontrada entre a inervação serotoninérgica e nitrérgica em *M. abbreviatus*. Alguns neurônios no SNEG e submucosos parecem compartilhar a mesma natureza química, o que se reflete também na distribuição das fibras nervosas. A mesma relação foi observada no circuito central do comportamento alimentar em *L. stagnalis* (SADAMOTO *et al.*, 1998), não seria inesperado se esta correlação também ocorresse no SNE.

Outras monoaminas presentes no tGI de invertebrados são a dopamina e a octopamina (MERCER & MCGREGOR, 1981; CSOKNYA *et al.*, 1992, 1997; HERNÁDI *et al.*, 1998). Em *M. abbreviatus* a fluorescência azul revelada pelo método do AG pode demonstrar a presença de catecolaminas atuando no controle do tGI nesta espécie. A presença de fibras e varicosidades catecolaminérgicas restringem-se a submucosa principalmente do reto e moela de *M. abbreviatus*, contrastando com a ampla distribuição descrita em *Chione stutchburyi* (MERCER & MCGREGOR, 1981) e com a presença de um plexo subepitelial em minhoca (CSOKNYA *et al.*, 1992). Outra constatação interessante é que

em *M. abbreviatus* o método do AG não revelou a presença de 5HT, confirmada pela imunohistoquímica, resultado inverso do obtido em minhoca, onde o anticorpo foi ineficaz na confirmação da fluorescência amarela típica da 5HT (CSOKNYA *et al.*, 1992). No entanto, a fluorescência azulada não revelou a presença de somas neuronais diferindo do descrito com a aplicação de imunohistoquímica para tirosina hidroxilase, método indireto para detecção da presença de dopamina, no trato alimentar de *Helix* (HERNÁDI *et al.*, 1998). Apesar de terem sido detectados neurônios e fibras dopaminérgicos em alguns gânglios do SNC em *M. abbreviatus*, não foram detectadas fibras dopaminérgicas de origem central penetrando na parede do intestino médio e posterior, tal qual observado nas outras técnicas aplicadas neste estudo. Acreditamos que as fibras nervosas e varicosidades fluorescentes encontradas no intestino posterior e moela de *M. abbreviatus* sejam dopaminérgicas, no entanto para confirmação seria necessária a realização de um ensaio imunohistoquímico para tirosina hidroxilase, visto que a presença de octopamina é outra opção a ser considerada. Esta catecolamina foi observada no SNP que participa do controle nervoso da brânquia em *Aplysia* (KUPFERMANN *et al.*, 1971; RUBEN *et al.*, 1979). Uma ampla rede octopaminérgica também foi descrita no SNP de minhoca, constituída por neurônios e feixes nervosos junto à face interna da túnica muscular do intestino médio do que no anterior e posterior (CSOKNYA *et al.*, 1997). Adrenalina e noradrenalina são encontradas em muito pouca quantidade nos gastrópodes (OSBORNE, 1984).

Assim como os neurônios e fibras do SNEG e do SNE, as células nervosas intra-epiteliais também apresentam uma natureza química ampla. No pulmonado *A. fulica* e no prosobrânquio *L. littorea* (ZAITSEVA & MARKOSOVA, 2008; ZAITSEVA *et al.*, 2009), assim como em *M. abbreviatus*, estas células apresentaram atividade colinesterásica e NADPHd, em ambos os tipos, fechado e aberto. No entanto, as células do tipo aberto mostraram maior imunorreatividade para 5HT do que para FMRFa em *M. abbreviatus*. Os neuritos que se ramificam da parte basal destas células nervosas intra-epiteliais formam um plexo subepitelial, cujas fibras comunicam-se, na sua maioria, com o PS e com o PM em *M. abbreviatus*, semelhante ao descrito para outros gastrópodes (ZAITSEVA, 2006; ZAITSEVA & KUZNETSOVA, 2008; ZAITSEVA & MARKOSOVA, 2008; ZAITSEVA *et al.*, 2009). Com base na sua localização e morfologia é sugerido que estas células desempenhem funções endócrinas e sensoriais em minhocas (TELKES *et al.*, 1996; BARNÁ *et al.*, 2001), estrela-do-mar (GARCÍA-ARRARÁS *et al.*, 2001) e gastrópodes (ZAITSEVA, 2006; ZAITSEVA & KUZNETSOVA, 2008;

ZAITSEVA & MARKOSOVA, 2008; ZAITSEVA *et al.*, 2009). Acreditamos que em *M. abbreviatus* estas células desempenhem estas mesmas funções, sendo análogas às células presentes no SD de vertebrados (REHFELD, 1998; MAAKE *et al.*, 1999). Contudo, seriam necessários estudos por microscopia eletrônica, eletrofisiológicos e farmacológicos para que esta hipótese seja confirmada.

Da mesma forma que não foram encontrados dados na literatura sobre a morfologia das células fusiformes, o código químico destas células não é mencionado para gastrópodes. Algumas destas células marcaram com os anticorpos e/ou processos enzimáticos testados, contudo, seria necessário um estudo imunohistoquímico para determinar a natureza destas células e se elas, realmente, representam o indício do aparecimento das células intersticiais de Cajal na escala evolutiva ou um outro componente do SNE em gastrópodes.

Nossos resultados demonstraram a presença de corpos celulares e processos GFAP-ir no tGI de *M. abbreviatus*, porém existem muito poucos estudos sobre a presença das células gliais no SNP em invertebrados. Os três tipos de células gliais descritos por Vernadakis & Roots (1995) referem-se a células que formam os envoltórios ou bainhas dos nervos. Apenas em insetos há uma referência de células enterogliais desempenhando um importante papel na neurogênese do SNE (COPENHAVER, 2007). A presença de atividade AChE e NADPHd nos processos terminais das células gliais do SNC de gastrópodes (Peruzzi *et al.*, 2004) é uma característica que também pode ser observada nas células enterogliais do tGI de *M. abbreviatus*, sugerindo que, assim como no SNC, ACh e NO possam mediar a comunicação neurônio-glia no SNE. Mais uma vez especulando, talvez os enterogliócitos atuem de maneira semelhante ao que vem sendo observado em vertebrados (RÜHL, 2005; BASSOTTI *et al.*, 2007ab; SILVEIRA *et al.*, 2007), que é o de participar na neuroplasticidade do SNE (BASSOTTI *et al.*, 2007ab).

5. CONCLUSÕES

Concluindo, nossos resultados apontam que a morfologia do tGI em *M. abbreviatus* apresenta algumas semelhanças ao descrito para outros estilomatóforos, apontando que esta espécie apresenta um certo grau de avanço evolutivo ao eliminar o ceco. Porém, conserva a complexidade do digestório de outros herbívoros, ao apresentar o estômago dividido em pró-ventrículo e moela. Esta característica do tGI acaba se refletindo, também, no aporte nervoso destinado ao intestino médio que apresenta uma inervação extrínseca direta e, ao mesmo tempo, uma indireta ambas associadas a inervação intrínseca. A inervação extrínseca direta ocorre por meio do nV, emitido pelo complexo subesofageal, enquanto que a indireta advém do SNEG, que pode ser considerado como análogo ao SNS dos vertebrados. A inervação intrínseca é representada pela ampla rede entérica, que se constitui pelos PS e PM. Já o reto apresenta o controle nervoso extrínseco, via nR emitido pelo complexo subesofageal, associado ao controle intrínseco por meio do SNE.

Este sistema nervoso periférico que inerva o tGI apresenta uma ampla natureza química em *M. abbreviatus*, que inclui axônios do SNC, via rG e nR, que podem conter fibras eferentes 5HT-ir, tanto eferentes como aferentes FMRFa-ir e fibras aferentes catecolaminérgicas. A intensa atividade enzimática da AChE e NADPHd obtida no plexo entérico serviu para a descrição da organização dos plexos entéricos e forneceu indícios da presença de sistemas colinérgicos e nitrérgicos participando das funções entéricas. A mesma diversidade química é observada no SNEG, que apresenta neurônios 5HT-ir e FMRFa-ir que se projetam para o estômago e intestino. Inervação nitrérgica e colinérgica também parecem estar presentes nesta segunda porção do controle extrínseco do tGI em *M. abbreviatus*. No SNE, o PS e o PM são constituídos por um grande número de neurônios, que apresentam neuritos catecolaminérgicos, 5HT-ir e FMRFa-ir, assim como também por neurônios de natureza possivelmente nitrérgica e colinérgica. Os diferentes mediadores respectivamente relacionados com os marcadores utilizados são, portanto, candidatos a exercer controle sobre a motilidade ou sobre as funções sensoriais e secretomotoras no tGI de *Megalobulimus abbreviatus*. As células nervosas intra-epiteliais e as fusiformes podem constituir outros elementos importantes do SNE, que poderiam constituir receptores sensoriais ou elementos neuroendócrinos. A presença de possíveis células intersticiais de Cajal poderia constituir mais um nível de controle na motilidade digestiva desta espécie,

sendo necessária uma investigação para confirmar a existência destas células em gastrópodes. Finalizando, a imunorreação à GFAP é uma evidência da presença de células enterogliais, que pode indicar a existência de interações entre os constituintes dos plexos neurais com a glia, tal qual ocorre no SNC dos moluscos ou outros invertebrados.

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados encontrados no presente trabalho foi possível estabelecer algumas conclusões referentes ao controle neurovisceral do caracol *M. abbreviatus*. Contudo, novas hipóteses foram formuladas, abrindo a possibilidade de novos estudos utilizando este modelo experimental.

1. Analisar ultra-estruturalmente, por intermédio de microscopia eletrônica de transmissão e varredura, a constituição da parede das diferentes partes do tGI, buscando comprovar a presença de células ciliadas e o arranjo em microvilosidades na mucosa do tGI, bem como a diferenciação dos demais tipos celulares e a presença de cutícula na mucosa gástrica.

2. Descrever a relação entre os constituintes do plexo entérico e os componentes do sistema nervoso estomatogástrico por meio de uma análise ultra-estrutural utilizando microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

3. Pesquisar a participação de outros neurotransmissores, tais como octopamina, GABA, glutamato, substância P, VIP, considerando apenas os mais comumente descritos para plexos entéricos em geral, além de determinar o padrão da inervação dopaminérgica por meio da imunoreatividade para estes transmissores no SNEG e no SNE do tGI.

4. Realizar a possível co-localização dos neurotransmissores já investigados no SNEG, bem como de outros possíveis transmissores envolvidos neste sistema por meio de microscopia confocal.

5. Descrever com recursos mais precisos como imunohistoquímica para visualizar com microscopia eletrônica as células nervosas intra-epiteliais e as células enterogliais. Para estas últimas, a microscopia confocal com outros marcadores, como para a proteína S-100 β também é outra alternativa.

6. Determinar se as células fusiformes representam as células intersticiais de Cajal por meio da aplicação de imunohistoquímica associada à microscopia óptica em secções do tGI, utilizando o c-Kit Oncoprotein Human-CD117.

7. Realizar estudos eletrofisiológicos e farmacológicos, por meio de um ensaio *ex vivo*, buscando determinar os níveis de controle funcional exercido pelo SNC, SNEG e do SNE no estômago, intestino e reto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYESEKERA AMD, BRECKENRIDGE W.R. 1979. The nervous system of *Achatina fulica* (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora). *Ceylon J. Sci. (Bio Sci)*. 13 (1-2): 89 – 107.
- ÁBRAHÁM A. 1940. Die innervation des darmkanals der gastropoden. *Z. Zellforsch.* 30(A): 273–296.
- ÁBRAHÁM A. 1983. Light- and electron-microscopic investigations into the gastro-intestinal nervous system of the vineyard snail (*Helix pomatia*). *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 97: 688-704.
- ACHAVAL M, PENHA MA, SWAROWSKY A, RIGON P, XAVIER LL, VIOLA GG, ZANCAN DM. 2005. The terrestrial gastropod *Megalobulimus abbreviatus* as an useful model in nociceptive experiments: the effects of morphine and naloxone in thermal avoidance behavior. *Braz J Med and Biol Res.* 38(1): 73-80.
- ALANIA M. 1995. Pleuro-buccal projections in pulmonate molluscs. *Acta Biol. Hung.* 46, 267–270.
- ALANIA M, PANCHIN YV, SAKHAROV DA. 1999. Pleural-buccal interneurons in the pteropod mollusc *Clione limacina*. *J. Comp. Physiol. A* 185, 267–275.
- ALANIA M, SAKHAROV DA, ELLIOTT CJH. 2002. Mechanisms of inhibition of feeding by a pleural interneuron in the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *J. Physiol., Lond.* 536P.
- ALBA Y, VILLARO AC, SESMA P, VAZQUEZ JJ, ABAURREA A. 1988. Gut endocrine cells in the snail *Helix aspersa*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70(3):363-73.
- ALEVIZOS A, BAILEY CH, CHEN M, KOESTER J. 1989. Innervation of vascular and cardiac muscle of *Aplysia* by multimodal motoneuron L7. *J. Neurophysiol.* 61: 1053-1063.
- ALEXANDER, CG, RAE, JC. 1974. The structure and formation of the crystalline style sac of *Telescopium telescopium* (Linnaeus)(Gastropoda: Prosobranchia). *Verliger* 17: 56-60.
- ALEXANDROWICZ JS. 1912. Zur kenntnis des sympatischen nervensystems einiger wirbellosen. *Z. allg. Physiol.* 14: 358-76.
- ALEXEEVA V, BOROVNIKOV D, MILLER MW, ROSEN SC, CROPPER EC. 1998. Effect of a serotonergic extrinsic modulatory neuron (MCC) on radula mechanoafferent function in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 80: 1609–1622.
- ANTKOWIAK T, CHASE R. 2003. Sensory innervation of the ovotestis in the snail *Helix aspersa*. *J Exp Biol* 206: 3913 – 921.
- AONUMA H. 2002. Distribution of NO-induced cGMP-like immunoreactive neurones in the abdominal nervous system of the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zool sci.* 19(9): 969-79.
- ARSHAVSKY YI, DELIAGINA TG, GAMKRELIDZE GN, ORLOVSKY GN, PANCHIN YV, POPOVA LB, SHUPLIAKOV OV. 1993. Pharmacologically induced elements of the hunting and feeding behavior in the pteropod mollusk *Clione limacina*. I. Effects of GABA. *J. Neurophysiol.* 69: 512–21.

- ARSHAVSKY, YI, DELIAGINA TG, MEIZEROV ES, ORLOVSKY GN, PANCHIN YV. 1988a. Control of feeding movements in the fresh-water snail *Planorbis corneus*. I. Rhythmical neurons of buccal ganglia. *Exp. Brain Res.* 70: 310–22.
- ARSHAVSKY YI, DELIAGINA TG, ORLOVSKY GN, PANCHIN YV 1988b. Control of feeding movements in the fresh-water snail *Planorbis corneus*. II. Activity of isolated neurons of buccal ganglia. *Exp. Brain Res.* 70: 323–31.
- ARSHAVSKY YI, DELIAGINA TG, ORLOVSKY GN, PANCHIN YV. 1988c. Control of feeding movements in the fresh-water snail *Planorbis corneus*. III. Organization of the feeding rhythm generator. *Exp. Brain Res.* 70: 332–41.
- AYALI A. 2004. The insect frontal ganglia and stomatogastric patterns generator networks. *Neurosignals* 13: 20–36.
- BABLANIAN GM, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1987. Motor control of the appetitive phase of feeding behavior in *Aplysia*. *Behav. Neural Biol.* 48: 394–407.
- BAGUST J, FITZSIMONS JTR, KERKUT GA. 1979. Evidence for integrating activity in the isolated intestinal nerve of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62: 397 – 408.
- BALABAN, PM 2002. Cellular mechanism of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosc. BioBehav. Rev.* 26: 597-630.
- BALASKAS C, SAFFREY MJ, BURNSTOCK G. 1995. Distribution of NADPH-diaphorase activity in the embryonic chicken gut. *Anat Embryol (Berl)*. 192 (3): 239-45.
- BANG Th. 1916. Zur morphologie des nervensystems von *Helix pomatia*, L. L. *Zool Ang* 281-91.
- BARNA J, CSOKNYA M, LÁZÁS ZS, BARTHÓ L, HÁMORI J. 2001. Distribution and action of some putative neurotransmitters in the stomatogastric nervous system of the earthworm, *Eisenia fetida (Oligochaeta, Annelida)*. *J. Neurocytol.* 30: 313 - 25.
- BARNES RSK, CALOW PP, OLIVE PJW, GOLDING DW, SPICER J I. 2001. *The Invertebrates: A Synthesis*. Blackwell, cap 9, 209-37. Feeding.
- BARNES, RD, HARRISON FW. 1994. Introduction to the Mollusca. In: HARRISON, F.W. & KOHN, A.J. (eds.). *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol.5: Mollusca I, New York: Wiley-Liss, 1-12.
- BARRINGTON EJW. 1974. *Invertebrate, Structure and Function*. Thomas Nelson and Sons, London.
- BASSOTTI G, VILLANACCI V, ANTONELLI E, MORELLI A, SALERNI B. 2007a. Enteric glial cells: new players in gastrointestinal motility? *Lab. Invest.* 87: 628-32.
- BASSOTTI G, VILLANACCI V, FISOGNI S, ROSSI E, BARONIO P, CLERICE C, MAURER CA, CATHOMAS G, ANTONELLI E. 2007b. Enteric glial cells and their role in gastrointestinal motor abnormalities: Introducing the neuro-gliopathies. *WJ Gastroenterol.* 13(30):4035-41.
- BAUX G, TAUC L. 1983. Carbacol can be released at a cholinergic ganglionic synapse as a false transmitter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 5126-28.

- BECQUAERT JC. 1948. Monograph of the family Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial mollusks. *Bull. Mus. Comp. Zool. Harvard.* 100:1-210.
- BERNOCCHI G, VIGNOLA C, SCHERINI E, NECCHI D, PISU MB. 1998. Bioactive peptides and serotonin immunocytochemistry in the cerebral ganglia of hibernating *Helix aspersa*. *J. Exp. Zool.* 280: 354–367.
- BIELER R. 1992. Gastropod phylogeny and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23:311-38.
- BISOGLI C. 1896. Le terminazione nervosa nelle fibre lisce delle tuniche muscolari del tubo digerente del *Limax subfuscus* e del *Limax agrestis*. *Anat. Anz.* 12: 249–57.
- BOER HH, KITS KS. 1990. Histochemical and ultrastructural study of the alimentary tract of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J Morphol* 205: 97-111.
- BONFATI ID. 1980. Histologia do tubo digestivo de *Megalobulimus*. *Bol. Inst. Cien. Biol. Geocie.* 28: 3-59.
- BOROVNIKOV D, EVANS CG, JING J, ROSEN SC, CROPPER EC. 2000. A proprioceptive role for an exteroceptive mechanoafferent neuron in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 20: 1990–2002.
- BRIERLEY MJ, YEOMAN MS, BENJAMIN PR. 1997a. Glutamatergic N2v cells are central pattern generator interneurons of the *Lymnaea* feeding system: New model for rhythm generation. *J. Neurophysiol.* 78: 3396–407.
- BRIERLEY MJ, YEOMAN MS, BENJAMIN PR. 1997b. Glutamate is the transmitter for N2v retraction phase interneurons of the *Lymnaea* feeding system. *J. Neurophysiol.* 78, 3408–3414.
- BROUGHT CN, WHITE KN. 1990. Functional morphology of the rectum in the marine gastropod *Littorina saxatilis* (Olivi) (Prosobranchia: Littorinoidea). *J. Molluscan Stud.* 56:97-108.
- BUCKETT KJ, DOCKRAY GJ, PETERS M, BENJAMIN PR. 1990a. Pharmacology of the myogenic heart of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 63: 1413-1425.
- BUCKETT KJ, OSBOURNE NN, DOCKRAY GJ, VAN MINNEN J, BENJAMIN PR. 1990b. Regulation of heartbeat in *Lymnaea* by motoneurons containing FMRFamide-like peptides. *J. Neurophysiol.* 63: 1426-1435.
- BULLOCH AGM, RIDGWAY RL. 1995. Comparative aspects of gastropod neurobiology. In: Breidbach O, Kutsch W. Basel (Eds.) *The Nervous Systems of Invertebrates. An Evolutionary and Comparative Approach.* Boston, Berlin.
- BULLOCK TH, HORRIDGE GA. 1965. Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates, San Francisco: Freeman and Co.
- BULLOCK TH. 1984. Comparative neuroscience holds promise for quiet revolutions. *Science:* 225(4661):473-78.
- CAMPBELL CBG, HODOS W. 1970. The concept of homology and the evolution of the nervous system. *Brain. Behav. Evol.* 3: 353-67.

- CARRIKER MR, BILSTAD NM. 1946. Hystology of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* say. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 65: 250-75.
- CARRIKER MR. 1946 Observations on the functioning of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* say. *Biol. Bull.* 91: 88-111.
- CARRIKER, MR. 1943. On the structure and function of the proboscis in the common oyster drill, *Urosalpinx cinerea* say. *J. Morphol.* 73: 441-506.
- CHASE R, ANTKOWIAK T, GEOFFROY E, WEATHERILL D. 2004. Why the ovotestis of *Helix aspersa* is innervated. *Acta Biol. Hung.* 55 (1-4): 239-49.
- CHASE R. 2002. *Behavioral & its neural control in gastropod mollusks*. New York: Oxford University Press.
- CHIEL HJ, KUPFERMANN I, WEISS KR. 1988. An identified histaminergic neuron can modulate the outputs of buccal-cerebral interneurons in *Aplysia* via presynaptic inhibition. *J. Neurosci.* 8: 49-63.
- CHRISTIE AE, CAIN SD, EDWARDS JM, CLASON TA, CHERNY E, LIN M, MANHAS AS, SELLEREIT KL, COWAN NG, NOLD KA, STRASSBURG H-P, GRAUBARD K. 2004. The anterior cardiac plexus: an intrinsic neurosecretory site within the stomatogastric nervous system of the crab *Cancer productus*. *J. Exp. Biol.* 207: 1163-182.
- CHURCH PJ, LLOYD PE. 1994. Activity of multiple identified motor neurons recorded intracellularly during evoked feeding like motor programs in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 72: 1794-809.
- COBB JLS. 1969. Modified cilia in the gut of the Lamellibranch Molluscs *Tapes watlingi*.
- COHAN CS, MPITSOS G.J. 1983. Selective recruitment of interganglionic interneurons during different motor patterns in *Pleurobranchaea*. *J. Exp. Biol.* 102: 43-57.
- COHEN JL, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1978. Motor control of buccal muscles in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 41: 157-180.
- COOK H. 1966. Morphology and histology of the central nervous system of *Succinea putris* (L). *Arch. Nederland. Zool.* 17 (1): 1-72.
- COPENHAVER PF. 2007. How to innervate a simple gut: familiar themes and unique aspects in the formation of the insect enteric nervous system. *Dev. Dyn.* 236 (7):1841-864.
- COPENHAVER PF, TAGHERT PH. 1991. Origin of the insect enteric nervous system: differentiation of the enteric ganglia from a neurogenic epithelium. *Development.* 113: 1115-132.
- COSTA M, BROOKES SH. 2008. Architecture of enteric neural circuits involved in intestinal motility. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 12 (Suppl 1): 3-19.
- CROLL RP. 1988. Distribution of monoamines within the central nervous system of the juvenile pulmonate snail, *Achatina fulica*. *Brain Research* 460 (1): 29-49.

- CROLL RP, DAVIS WJ. 1981. Motor program switching in *Pleurobranchaea*. I. Behavioural and electromyographic study of ingestion and egestion in intact specimens. *J. Comp. Physiol.* 145: 277–87.
- CROLL RP, DAVIS WJ. 1982. Motor program switching in *Pleurobranchaea*. II. Ingestion and egestion in the reduced preparation. *J. Comp. Physiol.* 147: 143–54.
- CROLL RP, KOVAC MP, DAVIS WJ. 1985a. Neural mechanisms of motor program switching in the molluscan *Pleurobranchaea*. II. Role of the ventral white cell, anterior ventral and B3 buccal neurons. *J. Neurosci.* 5: 56–63.
- CROLL RP, KOVAC MP, DAVIS WJ, MATERA EM. 1985b. Neural Mechanisms of motor program switching in the mollusc *Pleurobranchaea*. III. Role of the paracerebral neurons and other identified brain neurons. *J. Neurosci.* 5: 64–71.
- CROPPER EC, EVANS CG, HURWITZ I, JING J, PROEKT A, ROMERO A, ROSEN SC. 2004. Feeding neural networks in the mollusc *Aplysia*. *Neurosignals* 13(1-2):70-86.
- CSOKNYA M, LENGVARI I, BENEDECZKY I, HAMORI J. 1992. Immunohistochemical and ultrastructural study of the enteric nervous system of earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Acta Biol. Hung.* 43: 241–51.
- CSOKNYA M, BARNA J, BÁNVÖLGYI T, HIRIPI L, ECKERT M, HÁMORI J, ELEKES K. 1997. Octopamine-containing neurons in the alimentary tract of the earthworm (*Eisenia fetida*). *Brain Research* 778: 414–17.
- DA SILVA RSM, ZANCAN DM. 1994. Seasonal variation of the carbohydrate and lipid metabolism in a land pulmonate gastropod, *Megalobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 108A (2): 337-31.
- DAHL E, FALCK B, MECKLENBURG C, MYHRBERG H, ROSENGREN E. 1966. Neuronal localization of dopamine and 5-hydroxytryptamine in some mollusca. *Zeit. Zellforsch Mikroskop Anat.* 71: 489-98.
- DAVIS NT. 1982. Improved methods for cobalt filling and silver intensification of insect motor neurons. *Stain Technol.* 57: 239-24.
- DAVIS WJ, GILLETTE R. 1978. Neural correlates of behavioral plasticity in command neurons of *Pleurobranchaea*. *Science.* 199: 801–04.
- DAVIS WJ, MPITSOS GJ. 1971. Behavioral choice and habituation in the marine mollusc *Pleurobranchaea californica* MacFarland (Gastropoda, Opisthobranchia). *Z. Vergl. Physiol.* 75: 207–23.
- DAVIS WJ, KOVAC MP, CROLL RP, MATERA EM. 1984. Brain oscillator(s) underlying rhythmic cerebral and buccal motor output in the mollusk, *Pleurobranchaea californica*. *J. Exp. Biol.* 110: 1–15.
- DAVIS WJ, SIEGLER MV, MPITSOS GJ. 1973. Distributed neuronal oscillators and efference copy in the feeding system of *Pleurobranchaea*. *J. Neurophysiol.* 36: 258–74.

- DE FRAGA LS, DA SILVA RSM, ACHAVAL M, ZANCAN DM. 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J. Exp. Zool.* 301 (12): 968-78.
- DE FRAGA LS, DA SILVA RSM, ZANCAN DM. 2010. Control of carbohydrate metabolism in an anoxia-tolerant nervous system. *J. Exp. Zool. A*: 313(9): 539-47.
- DE JORGE FB, CINTRA ABU, HAESER PE, SAWAYA P. 1965. Biochemical studies on the snail *Strphpcheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comp. Biochem. Physiol.* 14:35-42.
- DE LA TORRE JC, SURGEON JW. 1976. A methodological approach to rapid and sensitive monoamine histofluorescence using a modified glyoxylic acid technique: the SPG method. *Histochemistry.* 49: 81-93.
- DEISLER JE, STANGE LA. 1982. The giant south american snail, *Megalobulimus oblongus* (Muller). *Entomology Circular* 239: 4p.
- DELANEY K, GELPERIN A. 1990. Cerebral interneurons controlling fictive feeding in *Limax maximus*. II. Initiation and modulation of fictive feeding. *J. Comp. Physiol.* 166: 311-26.
- DIAZ-RIOS M, SUESS E, MILLER MW. 1999. Localization of GABAlike immunoreactivity in the central nervous system of *Aplysia californica*. *J. Comp. Neurol.* 413: 255-270.
- DIERINGER N, KOESTER J, WEISS KR. 1978. Adaptive changes in heart rate of *Aplysia californica*. *J. Comp. Physiol.* 123: 11-21.
- DIMITRIADIS VK. 2001. Structure and function of the digestive system in Stylommatophora. In: Barker G. (ed). *Biology of terrestrial Mollusks*. Cambridge, MA, USA, CABI Publishing.
- DIMITRIADIS VK, HONDROS D, PIRPASOPOULOU A. 1992. Crop epithelium of normal fed, starved and hibernated snails *Helix lucorum*: A fine structural-cytochemical study. *Malacol.* 34(1-2): 343-54.
- DONELLI DC, ZANCAN DM, FACCIONI-HEUSER MC, ACHAVAL M. 1998. Localization of acid phosphatase activity in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774). *Braz. J. Morphol Sci.* 15 (1): 73-83.
- DORSETT DA. 1986. Brain to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. In: The Mollusca: neurobiology e behavior, v.9, part.2, p.101-77.
- ELEKES K, HERNÁDI L, MUREN JE, NÄSSEL DR. 1994 Peptidergic neurons in the snail *Helix pomatia* - Distribution of neurons in the central and peripheral nervous systems that react with an antibody raised to the insect neuropeptide, leucokinin-I. *J. Comp. Neurol.* 341 (2): 257-72.
- ELEKES K, RÓZSA KS, VEHOVSZKY A, HERNÁDI L, SALÁNKI J. 1985. Nerve cells and synaptic connections in the intestinal nerve of the snail, *Helix pomatia* L. *Cell Tissue Res.* 239: 611-620.
- ELEKES K, UDE J. 1994. Peripheral Connections Of Fmrfamide-Like Immunoreactive Neurons In The Snail, *Helix-Pomatia* - An Immunogold Electron-Microscopic Study . *J. Neurocytol.* 23 (12): 758-69.

- ELEKES K, KEMENES G, HIRIPI L, GEFFARD M, BENJAMIN PR. 1991. Dopamine-immunoreactive neurones in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Neurol.* 307: 214–24.
- ELLIOTT CJ, BENJAMIN PR. 1989. Esophageal mechanoreceptors in the feeding system of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurophysiol.* 61 (4): 727-36.
- ELLIOTT CJH, SUSSWEIN AJ. 2002. Comparative neuroethology of feeding control in molluscs. *J Exp. Biol.* 205 (7): 877-96.
- ELLIOTT CJH, VEHOVSZKY A. 2000. Comparative pharmacology of feeding in molluscs. *Acta Bio. Hung.* 51 (2-4): 153-163
- ELLIOTT CJH, KEMENES G. 1992. Cholinergic interneurons in the feeding system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. N1 interneurons make cholinergic synapses with feeding motoneurons. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 336: 167–80.
- ELPHICK MR, KEMENES G, STARAS K, O'SHEA M. 1995. Behavioral role for nitric-oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusk. *J. Neurosci.* 15: 7653–64.
- ELPHICK MR, MELARANGE R. 2001. Neural control of muscle relaxation in echinoderms. *J. Exp. Biol.* 204 (5): 875-85.
- EVANS CG, CROPPER EC. (1998). Proprioceptive input to feeding motor programs in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 18: 8016–8031.
- FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2004. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. and Biol. Res.* 37 (7): 1043-53.
- FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, LOPES C, ACHAVAL M. 1999. The ultrastructure of the neurones of the neural plexus in the pedal muscle of the snail *Megalobulimus oblongus*. *Acta Microscópica. C.* 8: 663-64.
- FACCIONI-HEUSER MC, VIEIRA MQ, LOPES C, ACHAVAL M. 2002. Ultrastructural features of the stomach of the snail *Megalobulimus oblongus*. *Acta Microscópica* 11 (2).
- FISHER WK. 1904. The anatomy of *Lottia gigantea* Gray. *Zool. Jahrb. Abt. Anat.* 20: 1-66.
- FOX LE, LLOYD PE. 1999. Glutamate is a fast excitatory transmitter at some buccal neuromuscular synapses in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 82: 1477–88.
- FRANCHINI A, OTTAVIANI E. 1992 Intestinal-Cell Types In The Fresh-Water Snail *Planorbium-Corneus* - Histochemical, Immunocytochemical And Ultrastructural Observations. *Tissue Cell* 24 (3): 387-96.
- FRETTER V, GRAHAM A. 1949. Structure and mode of life of the *Pyramidellidae*. *J. Marine Biol. Assoc. U.K.* 28: 493-532.
- FRETTER V, GRAHAM A. 1962. *British prosobranch molluscs*. Ray Society, London, 755p.

- FRETTER V. 1939. The structure and function of the alimentary canal of some tectibranch molluscs, with note on excretion. *Trans. R. Soc. Edinb.* 59: 599-646.
- FRETTER V. 1941. The genital ducts of some British stenoglossan prosobranchs. *J. mar. Biol. Assoc. U. K.* 25: 173-211.
- FRETTER V. 1943. Studies on the functional morphology and embryology of *Onchidella celtica* (Forbes and Hanley) and their bearings on its relationships. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 25(4): 685-720.
- FUJISAWA Y, FURUKAWA Y, OHTA S, ELLIS TA, DEMBROW NC, LI L, FLOYD PD, SWEEDLER JV, MINAKATA H, NAKAMARU K, MORISHITA F, MATSUSHIMA O, WEISS KR, VILIM FS. 1999. The *Aplysia mytilus* inhibitory peptide-related peptides: identification, cloning, processing, distribution and action. *J. Neurosci.* 19: 9618-34.
- FURUKAWA Y, NAKAMARU K, WAKAYAMA H, FUJISAWA Y, MINAKATA H, OHTA S, MORISHITA F, MATSUSHIMA O, LI L, ROMANOVA E, SWEEDLER JV, PARK JH, ROMERO A, CROPPER EC, DEMBROW NC, JING J, WEISS KR, VILIM FS. 2001. The enterins: a novel family of neuropeptides isolated from the enteric nervous system and CNS of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 21: 8247-8261.
- FURUKAWA Y, KOBAYASHI M. 1987. Neural control of heart beat in the African giant snail, *Achatina fulica* Ferussac. I. Identification of the heart regulatory neurons. *J. Exp. Biol.* 129: 279-293.
- GABE, M. 1951. Données histologiques sur les organes du complexe palléal chez la Fissurelle. *Bull. Lab. Marit. Dinard.* 35: 1-14.
- GARCÍA-ARRARÁS JE, ROJAS-SOTO M, JIMÉNEZ LB, DÍAZ-MIRANDA L. 2001. The enteric nervous system of Echinoderms: Unexpected complexity revealed by neurochemical analysis. *J. Exp. Biol.* 204: 865-73.
- GARVEN HSD, GAIRNS FW. 1952. The silver diammine ion staining of peripheral nerve elements and the interpretation of the results: with a modification of the Bielschowsky-Gros method for frozen sections. *Q. J. Physiol. Cogn. Med. Sci.* 37: 131 -142.
- GASPAR PK, MARCUZZO S, RIGON P, MOLINA CG, ACHAVAL M. 2007. Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signalling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comp. Biochem. Physiol.* 148A: 286-91.
- GELPERIN A, FLORES J, RACCUIA-BEHLING F, COOKE IC. 2000. Nitric oxide and carbon monoxide modulate oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusk. *J. Neurophysiol.* 83: 116-127.
- GHOSE KC. 1962. The nervous system of *Achatina fulica* Browdich. *Ann. Zool.* 4 (3): 25-37.
- GHOSE KC. 1963. The alimentary system of *Achatina fulica*. *Trans. Am. Microsc. Soc.* 82: 149-67.

- GIARDINO ND, ALOYZ RS, ZOLLINGER M, MILLER MW, DESGROSEILLERS, L. 1996. L5-67 and LUQ-1 peptide precursors of *Aplysia californica*: Distribution and localization of immunoreactivity in the central nervous system and in peripheral tissues. *J. Comp. Neurol.* 374 (2): 230-45.
- GILLETTE MU, GILLETTE R. 1983. Bursting neurons command consummatory feeding behavior and coordinated visceral receptivity in the predatory mollusk *Pleurobranchaea*. *J. Neurosci.* 3: 1791–806.
- GILLETTE R, DAVIS WJ. 1977. The role of the metacerebral giant neuron in the feeding behavior of *Pleurobranchaea*. *J. Comp. Physiol.* 116: 129–159.
- GILLETTE R, KOVAC MP, DAVIS WJ. 1978. Command neurons in *Pleurobranchaea* receive synaptic feedback from motor networks they excite. *Science.* 199: 798–801.
- GOSLINER T. 1981. Origins and relationships of primitive members of the Opisthobranchia (Mollusca: Gastropoda). *Biol. J. Linn. Soc.* 16: 197-225.
- GRAHAM, A. 1932. Structure and function of the alimentary canal of *Patella*. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh.* 57: 287-308.
- GRAHAM, A. 1941. Esophagus of Stenoglossan prosobranchs. *Proc. Roy. Soc. Edinburgh, sect. B.* 61: 737-78.
- GRAHAM, A. 1985. Evolution within the Gastropoda: prosobranchia. *In: Trueman ER., Clarke MR. (eds): The Mollusca, vol. 10, Evolution.* New York : Academic Press, pp 151-86.
- GOSPE SM. 1983. Studies of dopamine pharmacology in molluscs. *Life Sci.* 33: 1945-1957.
- GRASSÉ P. 1968. *Traité de Zoologie.* Manon & Cia. Edit., Paris, 1a Ed. Tome V, Fasc. III.
- GUARDABASSI A, FERRERI E. 1953. Istofisiologica dell'apparato digerente di *Helix pomatia*. *Arch. Zool. Ital.* 38. Publ. Guibilau Pierrantoni pt. II.
- GUTHRIE, PB, NEUHOFF, V, OSBORNE, NN. 1975. Dopamine, noradrenaline, octopamine and tyrosine-hydroxylase in gastropod *Helix pomatia*. *Comp. Biochem. Physiol (C)* 52: 109-11.
- HALASY K, BENEDECZKY I, FEKETE E, TOTH L, GABRIEL R. 1988. Enteric neuromuscular junctions: comparison of ultrastructural features in different phylogenetic groups. *Neuroscience.* 25 (1):147-62.
- 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.
- HARTENSTEIN V. 1997. Development of the insect stomatogastric nervous system. *TINS* 20 (9): 421-27.
- HASZPRUNAR G. 1988a. A preliminary phylogentic analysis of the streptoneurous gastropods in Prosobranch Phylogeny. *Malacol Rev (Suppl)* 4: 7-17.

- HASZPRUNAR G. 1988b. On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura. *J. Moll. Stud.* 54: 367-441.
- HATAKEYAMA D, ITO S. 2000. Distribution and developmental changes in GABA-like immunoreactive neurons in the central nervous system of pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *J. Comp. Neurol.* 418 (3): 310-22.
- HAYDON PG, WINLOW W. 1981. Morphology of the giant dopamine-containing neurone, R.Pe.D.I, in *Lymnaea stagnalis* revealed by Lucifer yellow. *J. Exp. Biol.* 94: 149-57.
- HERMANS CO, SATTERLIE RA. 1992. Fast-strike feeding behavior in a pteropod mollusc, *Clione limacina* Phipps. *Biol. Bull.* 182, 1-7.
- HERNÁDI L, ERDELYI 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: 177-187.
- HERNÁDI L, ERDELYI L, HIRIPI L, ELEKES K. 1998. The organization of serotonin-, dopamine-, and FMRFamide-containing neuronal elements and their possible role in the regulation of spontaneous contraction of the gastrointestinal tract in the snail *Helix pomatia*. *J. Neurocytol.* 27 (10):761-75.
- HERNADI, L. 1994. Distribution and anatomy of GABA-like immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous-system of the snail *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res.* 277: 189-98.
- HERNÁDI L, JUHOS S, ELEKES K. 1993. Distribution of dopamine-immunoreactive and tyrosinehydroxylase-immunoreactive neuron in the central nervous system of *Helix pomatia*. *Cell Tissue Res.* 274: 503-13.
- HERNÁDI L, ELEKES K, S-RÓSZÁ K. 1989. Distribution of serotonin-containing neurons in the central system of the snail *Helix pomatia*. A comparative immunocytochemical and 5,6 dehydroxytryptamine-labeling study. *Cell Tissue Res.* 257: 313-23.
- HETHERINGTON MS, MCKENZIE JD, DEAN HG, 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)* 107: 83-93.
- HIROSE E. 2005. Digestive system of the Sacoglossan *Plakobranthus ocellatus* (Gastropoda: Opisthobranchia): Ligth- and electronmicroscopic observations with remarks on chloroplast retention. *Zoo. Sci.* 22: 905-15.
- HOFFMAN H. 1925. Die vanginuliden. Ein beitrag zur kenntnis ihre Biologie, Anatomie, Systematik, Geographiscen Verbreitung und Phylogenie (Fauna et Anatomie Ceylanica, III, Nr. 1). *Jena Zeitschr Naturwiss.* 61 (1-2): 1-374.
- HORN ACM, ACHAVAL M, ZANCAN DM. 2005. The annual reproductive cycle of the snail *Megalobulimus abbreviatus* Müller, 1774 (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Biol.*: 65(3): 459-67.

- HOWELLS HH. 1942. The structure and function of the alimentary canal of *Aplysia punctata*. *Q. J. Microsc. Sci.* 83: 357-97.
- HURWITZ, I., GOLDSTEIN, R. S. AND SUSSWEIN, A. J. 1994. Compartmentalization of pattern-initiation and motor functions in the B31 and B32 neurons of the buccal ganglia of *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* 71: 1514-27.
- HURWITZ I, NEUSTADTER D, MORTON DW, CHIEL HJ, SUSSWEIN AJ. 1996. Activity patterns of the B31/B32 pattern initiators innervating the I2 muscle of the buccal mass during normal feeding movements in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* 75: 1309-26.
- HURWITZ I, KUPFERMANN I, SUSSWEIN AJ. 1997. Different roles of neurons B63 and B34 that are active during the protraction phase of buccal motor programs in *Aplysia californica*. *J. Neurophysiol.* 78: 1305-19.
- HURWITZ I KUPFERMANN I, WEISS KR. 1999a. Initiation and maintenance of protraction phase of feeding motor program in *Aplysia*. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25: 1643.
- HURWITZ I, PERRINS R, XIN Y, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1999b. C-PR neuron of *Aplysia* has differential effects on 'feeding' cerebral interneurons, including myomodulin-positive CBI-12. *J. Neurophysiol.* 81: 521-34.
- HYMAN LH. 1967. *The invertebrates*, vol. 6: Mollusca I, USA: McGraw-Hill, 549-769.
- IERUSALIMSKY VN, BALABAN PM. 2006. Immunoreactivity to molluscan neuropeptides in the central and stomatogastric nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Cell Tissue Res.* 325:555-65.
- ITO S, KUROKAWA M. 2004a. Synchronous activities of neurons distributed throughout the neural plexus of the digestive organs in *Aplysia*. *Zool Sci.* 21: 1314.
- ITO S, KUROKAWA M. 2004b. Gizzard movements in *Aplysia* are composed of both neurogenic contractions attributable to the peripheral neurons and myogenic contraction. *Comp. Biochem. Physiol.* 139: 774.
- ITO S, KUROKAWA M. 2002. Peripheral neural activities in the digestive system of *Aplysia*. *Zool Sci.* 19: 1468.
- ITO S, KUROKAWA M. 2007. Coordinated peripheral neuronal activities among the different regions of the digestive tract in *Aplysia*. *Zoo Sci.* 24: 714-22.
- JABONERO V, RODRIGO J. 1966. Mikroskopische studien ueber die innervations des verdauungstraktes. II. Weitere beobachtungen ueber die gangliezellen von typus I nach Dogiel. *Trab. Inst. Cajal. Invest. Biol.* 58: 199-222.
- JAEGER CP. 1961. Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 4: 30-32.
- JAEGER, C.P. 1965. Giant snail is used for muscle studies. *Nat. Hist.* 74: 26-27.

- JANAHMADI M, MALMIERCA MS, HEARNE PG, GREEN GG, SANDERS DJ. 1999. Morphological and electrophysiological features of F76 and D1 neurones of the sub-oesophageal ganglia of *Helix aspersa* in vitro and in culture. *Anat Embryol (Berl)*. 199 (6): 563-72.
- KABOTYANSKI EA, BAXTER DA, BYRNE JH. 1998. Identification and characterization of catecholaminergic neuron B65, which initiates and modifies patterned activity in the buccal ganglia. *J. Neurophysiol*. 79: 605–21.
- KANDEL ER. 2000. The molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science*. 294: 1030-38.
- KANDEL ER, SCHWARTZ JH, JESSEL TM. 2000. *Principles of Neural Science*. McGraw-Hill. New York.
- KARILA P, HOLMGREN S. 1995. Enteric reflexes and nitric oxide in the fish intestine. *J. exp. Biol*. 198: 2405-12.
- KARNOVSKY MJ, ROOTS L. 1964. A "direct-coloring" method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem*. 12: 219-21
- KATZ PK, HARRIS-WARRICK RM. 1999. The evolution of neuronal circuits underlying species-specific behavior. *Curr. Op. Neurobiol*. 9: 628-633.
- KATZ PS, TAZAKI K. Comparative and evolutionary aspects of the crustacean stomatogastric system. In: Harris-Warrick RM, Marder E, Selverston AI, Moulins M (eds.). *Dynamic Biological Networks*. Boston: MIT Press, 1992:221–61.
- KATZ PS. 2007. Evolution and development of neural circuits in invertebrates. *Curr. Op. Neurobiol*. 17: 59-64.
- KEATING, C. AND LLOYD, P. E. (1999). Differential modulation of motor neurons that innervate the same muscle but use different excitatory transmitters in *Aplysia*. *J. Neurophysiol*. 82: 1759-67.
- KEMENES G, HIRIPI L, BENJAMIN PR. 1990. Behavioral and biochemical-changes in the feeding system of *Lymnaea* induced by the dopamine and serotonin neurotoxins 6-hydroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 329: 243–55.
- KERKHOVEN RM, CROLL RP, RAMKEMA MD, VAN MINNEN J, BOGERD J, BOER HH. 1992. The VD₁/RPD₂ neuronal system in the central nervous system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* studied by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Cell Tissue Res*. 267: 551-59.
- KERKUT GA, LAMBERT JDC, GAYTON RJ, LOKER JE, WALKER RJ. 1975. Mapping of nerve cells in the subesophageal ganglia of *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 50: 1-25.
- KING MS, DELANEY K, GELPERIN A. 1987. Acetylcholine activates cerebral interneurons and feeding motor program in *Limax maximus*. *J. Neurobiol*. 18: 509–30.
- KLEIN AN, WEISS KR, CROPPER EC. 2000. Glutamate is the fast excitatory neurotransmitter of small cardioactive peptide-containing *Aplysia radula* mechanoafferent neuron B21. *Neurosci. Lett*. 289: 37–40.

- KLEMM N, HUSTERT R, CANTERA R, NASSEL DR. 1986. Neurons reactive to antibodies against serotonin in the stomatogastric nervous system and in the alimentary canal of locust and crickets (Orthoptera, Insecta). *Neuroscience* 17: 247–61.
- KOCH UT, KOESTER J, WEISS KR. 1984. Neuronal mediation of cardiovascular effects of food arousal in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 51 (1): 126-35.
- KOH HY, JACKLET JW. 1999. Nitric oxide stimulates cGMP production and mimics synaptic responses in metacerebral neurons of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 19: 3818–26.
- KORNEEV SA, PARK JH, O'SHEA M. 1999. Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. *J. Neurosci.* 19: 7711–20.
- KORNEEV SA, PIPER MR, PICOT J, PHILLIPS R, KORNEEVA EI, O'SHEA M. 1998. Molecular characterization of NOS in a mollusc: Expression in a giant modulatory neuron. *J. Neurobiol.* 35: 65–76.
- KOVAC MP, DAVIS WJ, MATERA EM, CROLL RP. 1983. Organization of synaptic inputs to paracerebral feeding command interneurons of *Pleurobranchaea californica*. II. Inhibitory inputs. *J. Neurophysiol.* 49: 1539–56.
- KRUATRACHUE M, UPATHAM ES, SEEHABUTR V, CHAVADEJ J, SRETARUGSA P, SOBHON P. 1993. General anatomy and histology of the nervous system in *Achatina fulica*. *J. Sci. Soc. Thailand.* 19: 1-24.
- KÜKENTHAL W, MATTES E, RENNER M. 1969. Guia de trabalhos práticos de Zoologia. Atlântida ed., Coimbra, 15ª. Ed.147-56.
- KUPFERMANN I, PINSKER H, CASTELLUCCI V, KANDEL ER. 1971. Central and peripheral control of gill movements in *Aplysia*. *Science.* 174 (15):1252-56.
- KUPFERMANN I. 1974. Feeding in *Aplysia*: a simple system for the study of motivation. *Behav. Biol.* 10: 1–26.
- KUPFERMANN I. 1997. The role of modulatory systems in optimizing behavior: studies of feeding in the mollusc *Aplysia californica*. *Zoology.* 100: 235–43.
- KUPFERMANN I, TEYKE T, ROSEN SC, WEISS KR. 1991. Studies of behavioral state in *Aplysia*. *Biol. Bull.* 180: 262–68.
- KUROKAWA M, ITO S, OKAMOTO T. 2008. Activities and functions of peripheral neurons in the enteric nervous system of *Aplysia* and *Lymnaea*. *Acta Biol. Hung.* 59: 65–71
- KUSHNER PD, BARKER DL. 1983. A neurochemical description of the dopaminergic innervation of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster. *J. Neurobiol.* 14: 17–28.
- KUSLANSKY B, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1987. Mechanisms underlying satiation of feeding-behavior of the mollusk *Aplysia*. *Behav. Neural Biol.* 48: 278–303.

- KYRIAKIDES MA, MCCROHAN CR. 1989. Effect of putative neuromodulators on rhythmic buccal motor output in *Lymnaea stagnalis*. *J. Neurobiol.* 20: 635–50.
- LACAZE-DUTHIERS H. 1898. Les ganglions dits palléaux et le stomatogastrique de quelques gastéropodes. *Arch. Zool. exp. gén.* 6 (3): 331 – 428.
- LEAL-ZANCHET AM, THOMÉ JW, HAUSER J. 1990. Microanatomia e histologia do sistema digestivo de *Phyllocaulis soleiformis* (Orbigny, 1835) (Mollusca: Gastropoda: Veronicellidae) – III. Tubo digestivo (Do estômago ao reto). *Caatinga* 7: 76-104.
- LEAL-ZANCHET AM. 1998. Comparative studies on the anatomy and histology of the alimentary canal of the Limacoidea and Milacidae (Pulmonata: Stylommatophora). *Malacol.* 39 (1-2): 39-57.
- LLOYD PE, CHURCH PJ. 1994. Cholinergic neuromuscular synapses in *Aplysia* have low endogenous Acetylcholinesterase activity and high-affinity uptake system for Acetylcholine. *J Neurosci.* 14 (11): 6722-733.
- LLOYD PE, KUPFERMANN I, WEISS KR. 1988. Central peptidergic neurons regulate gut motility in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 59 (5):1613-26.
- LOBO-DA-CUNHA A, BATISTA-PINTO C. 2003. Stomach cells of *Aplysia depilans* (Mollusca, Opisthobranchia): a histochemical, ultrastructural and cytochemical study. *J. Morphol.* 256:360-70.
- LOBO-da-CUNHA A, BATISTA-PINTO C. 2005. Light and electron microscopy studies of the oesophagus and crop epithelium in *Aplysiadepilans* (Mollusca, Opisthobranchia). *Tissue e Cell* 37: 447- 56.
- LONDON JA, GILLETTE R. (1984a). Rhythmic and bilaterally coordinated motor-activity in the isolated brain of *Pleurobranchaea*. *J. Exp. Biol.* 108: 471–75.
- LONDON JA, GILLETTE R. (1984b). Functional roles and circuitry in an inhibitory pathway to feeding command neurones in *Pleurobranchaea*. *J. Exp. Biol.* 113: 423–446.
- LUCHTEL DL, MARTIN AW, DEYRUP-OLSEN I, BOER HH. 1997. Gastropoda: Pulmonata IN: Harrison FW, Kohn AJ. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., New York. V. 6B: Mollusca, p. 458-718.
- LUFTY RG, DEMIAN ES. 1976. The histology of the alimentary system of *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullaridae). *Malacol.* 5: 375-422.
- MAAKE C, KLOAS W, SZENDEFI M, REINECKE M. 1999. Neurohormonal peptides, serotonin, and nitric oxide synthase in the enteric nervous system and endocrine cells of the gastrointestinal tract of neonatal and thyroid hormone-treated axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cell Tissue Res.* 297: 91–101.
- MACKINTOSH NA. 1925. The crystalline style in gastropods. *Q. J. Microsc. Sci.* 69: 317-42.

- MAGOSKI NS, BULOCCH ACM. 1998. Dopamine activates two different receptors to produce variability in sign at an identified synapse. *J. Neurophysiol.* 81(3): 1330-40.
- MARCHAND CR, COLARD C. 1991. Presence of cells and fibers immunoreactive toward antibodies to different peptides or amine in the digestive tract of the snail *Helix aspersa*. *J. Morphol.* 201: 185-90.
- MARDER E, CALABRESE RL. 1996. Principles of rhythmic motor pattern generation. *Physiol. Rev.* 76: 687-717.
- MARSDEN C, KERKUT GA. 1970. The occurrence of monoamines in *Planorbis corneus*: A fluorescence microscopic and microspectrometric study. *Comp. gen. Pharmac.* 1: 101-16.
- MCCLELLAN AD. 1982a. Movements and motor patterns of the buccal mass of *Pleurobranchaea* during feeding, regurgitation and rejection. *J. Exp. Biol.* 98: 195-211.
- MCCLELLAN AD. 1982b. Re-examination of presumed feeding motoractivity in the isolated nervous system of *Pleurobranchaea*. *J. Exp. Biol.* 98: 213-28.
- MCCLELLAN AD. 1983a. Higher order neurons in cerebral ganglia of *Pleurobranchaea* have diverse effects on buccal motor patterns. *J. Comp. Physiol.* 153: 533-41.
- MCCLELLAN AD. 1983b. Higher order neurons in buccal ganglia of *Pleurobranchaea* elicit vomiting motor activity. *J. Neurophysiol.* 50: 658-70.
- MCCROHAN CR. 1984. Initiation of feeding motor output by an identified interneurone in the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 113: 351-66.
- MCCROHAN CR, AUDESIRK TE. 1987. Initiation, maintenance and modification of patterned buccal motor output by the cerebral giant-cells of *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol A.* 87: 969-77.
- MCCROHAN CR, BENJAMIN PR. 1980a. Patterns of activity and axonal projections of the cerebral giant cells of the snail *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 85: 149-68.
- MCCROHAN CR, BENJAMIN PR. 1980b. Synaptic relationships of the cerebral giant cells with motoneurons in the feeding system of *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 85: 169-86.
- MCCROHAN CR, CROLL RP. 1997. Characterization of an identified cerebrobuccal neuron containing the neuropeptide APGWamide (Ala-Pro-Gly-Trp-NH₂) in the snail *Lymnaea stagnalis*. *Invert. Neurosci.* 2: 273-82.
- MERCER AR, MCGREGOR DD 1981 Innervation of the intestine in the bivalve mollusc *Chione stutchburyi*. *Cell Tissue Res.* 218 (1): 191-207
- MEYRAND P, MARDER E. 1991 Matching neural and muscle oscillators: Control by FMRFamide-like peptides. *J. Neurosci.* 11: 1150-61.

- MILLER MW, ROSEN SC, SCHISSEL SL, CROPPER EC, KUPFERMANN I, WEISS KR. 1994. A population of SCP-containing neurons in the buccal ganglion of *Aplysia* are radula mechanoafferents and receive excitation of central origin. *J. Neurosci.* 14: 7008–23.
- MORAES G, ACHAVAL M, DAL PIVA MM, FACCIONI-HEUSER MC, WASSERMANN GF, ZANCAN D M. 2010. Ultrastructural analysis of the dorsal body gland of the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Braz. J. Biol.* 70 (2): 341-50.
- MORIELLI AD, MATERA EM, KOVAC MP, SHRUM RG, MCCORMACK KJ, DAVIS WJ. 1986. Cholinergic suppression: a postsynaptic mechanism of long-term associative learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4556–60.
- MORIGUCHI-JECKEL CM. 2001. Imunorreatividade a FRMF-amida no sistema nervoso central e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. [Dissertação de Mestrado] Porto Alegre, 90f. Ciências Biológicas: Neurociências – UFRGS.
- MORISHITA F, NAKANISHI Y, SASAKI K, KANEMARU K, FURUKAWA Y, MATSUSHIMA O. 2003. Distribution of the *Aplysia* cardioexcitatory peptide, NdWamide in the central and peripheral nervous systems of *Aplysia*. *Cell Tissue Res.* 312: 95–111.
- MOROZ L, GILLETTE R. 1996. NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. *J. Comp. Neurol.* 367: 607-22.
- MOROZ LL. 2000. Giant identified NO-releasing neurons and comparative histochemistry of putative nitergic systems in gastropod molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 49 (6): 557-69.
- MOROZ LL, NOREKIAN TP, PIRTLE TJ, ROBERTSON KJ, SATTERLIE RA. 2000. Distribution of NADPH-diaphorase reactivity and effects of nitric oxide on feeding and locomotory circuitry in the pteropod mollusc, *Clione limacina*. *J. Comp. Neurol.* 427: 274–84.
- MOROZ LL, PARK JH, WINLOW W. 1993. Nitric-oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport.* 4: 643–46.
- MOROZ LL, SUDLOW LC, JING J, GILLETTE R. 1997. Serotoninimmunoreactivity in peripheral tissues of the opisthobranch molluscs *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. *J. Comp. Neurol.* 382: 176–88.
- MORTON JE. 1955a. The functional morphology of the British Ellobiidae (Gastropoda, Pulmonata) with special reference to the digestive and reproductive systems. *Phil. Trans. Royal Soc. London* (B) 230: 89-160.
- MORTON JE. 1955b. The functional morphology of *Otina otis*, a primitive marine pulmonate. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 34: 113-50.
- MORTON DW, CHIEL HJ. 1993a. *In vivo* buccal nerve activity that distinguishes ingestion from rejection can be used to predict behavioral transitions in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A* 172: 17–32.

- MORTON DW, CHIEL HJ. 1993b. The timing of activity in motor neurons that produce radula movements distinguishes ingestion from rejection in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol A* 173: 519–36.
- MULLONEY B, SELVERSTON AI. 1974. Organization of the stomatogastric ganglion of the spiny lobster I, II, III. *J. Comp. Physiol.* 91: 1-74.
- MULLONEY B. 1987. Neural circuits. *IV*: Selverston AI, Moulins M. (eds): *The crustacean stomatogastric system*. Springer-Verlag, Berlin. 110-45.
- MULLONEY B, HALL WM. 1990. GABA-ergic neurons in the crayfish nervous system: An immunocytochemical census of the segmental ganglia and stomatogastric system. *J. Comp. Neurol.* 291: 383–94.
- MURPHY AD. 1990. An identified pleural ganglion interneuron inhibits patterned motor-activity in the buccal ganglia of the snail, *Helisoma*. *Brain Res.* 525: 300–03.
- MURPHY AD, LUKOWIAK K, STELL WK. 1985. Peptidergic modulation of patterned motor-activity in identified neurons of *Helisoma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 7140–44.
- MURPHY AD. 2001. The neuronal basis of feeding in the snail, *Helisoma*, with comparisons to selected gastropods. *Prog. Neurobiol.* 63 (4):383-408.
- NAGAHAMA T, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1993. Effects of cerebral neuron C-PR on body muscles associated with a food-induced arousal state in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 70: 1231–43.
- NAGAHAMA T, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1994. Body postural muscles active during food arousal in *Aplysia* are modulated by diverse neurons that receive monosynaptic excitation from the neurons C-PR. *J. Neurophysiol.* 72: 314–25.
- NARGEOT R, BAXTER DA, BYRNE JH. 1999. *In vitro* analog of operant conditioning in *Aplysia*. II. Modifications of the functional dynamics of an identified neuron contribute to motor pattern selection. *J. Neurosci.* 19: 2261–72.
- NISBET RH. 1961. Some aspects of the structure and function of the nervous system of *Archachatina* (*Calachatina*) *marginata* (Swainson). *Proc. Roy. Soc. London.* B 154: 269-87.
- NÓBLEGA HG, RIGON F, STERNET, FACCIONI-HEUSER MC, ACHAVAL M. 2006. Permeability of haemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructural approach. *Comp. Biochem. Physiol A*: 144 (1): 119-24.
- NÓBLEGA HG, MISSAGLIA V, STENERT C, FACCIONI-HEUSER, MC, ACHAVAL M. 2003. Vascular supply of the central nervous system of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36(9) 1247-53.
- OKAMOTO T, ELEKES K, KUROKAWA M. 2007. Distribution of neurotransmitters in the enteric nervous system of *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B*: 148 (3):351
- OKAMOTO T, KUROKAWA M. 2010. The Role of the Peripheral Enteric Nervous System in the Control of Gut Motility in the Snail *Lymnaea stagnalis*. *Zoo Sci.* 27: 602–10

- OLAND LA, ORR G, TOLBERT LP. 1990. Construction of a protoglomerular template by olfactory axons initiates the formation of olfactory glomeruli in the insect brain. *J. Neurosci.* 70(7): 2096-12.
- OLIVEIRA DF. 2006. Caracterização dos neurônios envolvidos na ventilação pulmonar de *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda:Pulmonata). Porto Alegre, 88 p. [Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia, UFRGS].
- OLSSON C, GIBBINS I. 1999. Nitric oxide synthase in the gastrointestinal tract of the estuarine crocodile, *Crocodylus porosus*. *Cell Tissue Res.* 296 (2):433-37.
- OSBORNE, N.N. & COTTRELL, G.A. 1971. Distribution of biogenic amines in the slug, *Limax maximus*. *Z. Zellforsch.* 112: 15-30.
- OSBORNE NN. 1984. Phenylethanolamine-N-methyltransferase and dopamine- β -hydroxylase immunoreactivity and the occurrence of noradrenaline and adrenaline in the nervous system of the snail *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res.* 237: 605-608.
- OTTAVIANI E, CASELGRANDI E, FRANCHINI A. 1988. Epinephrine investigation in the snail brain of *Helicella virgata* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol. C* 89: 267-269.
- PANIAGUA RGA, NISTAL MMS. 1983. *Introducción a la histología animal comparada (Atlas libro da la estructura microscópica de los animales)*. Calábria, Editorial Labor, Espanha, 181-232.
- PARAVICINI G. 1898. Sulla minuta innervazione del canale digerente dell' *Helix pomatia*. *Boll. Scient.* 2 a 4.
- PARK JH, STRAUB VA, O'SHEA M. 1998. Anterograde signaling by nitric oxide: Characterization and *in vitro* reconstitution of an identified nitroergic synapse. *J. Neurosci.* 18: 5463-76.
- PARMENTIER J. 1973. Mapping studies of gastropod brain. *Brain Res.* 59: 201-10.
- PEARSE AEG. 1972. *Histochemistry, theoretical and applied* Vol 2. 3rd ed, Churchill Livingstone, London.
- PENA MS, SALGADO NC, COELHO ACS. 2004. Recharacterization of *Strophocheilus miersi* Da Costa (Mollusca, Pulmonata, Strophocheilidae). *Rev. Bras. Zool.* 21(1): 45-50.
- PERRINS R, WEISS KR. 1996. A cerebral central pattern generator in *Aplysia* and its connections with buccal feeding circuitry. *J. Neurosci.* 16: 7030-45.
- PERRY S J, STRAUB VA, KEMENES G, SANTAMA N, WORSTER BM, BURKE JF, BENJAMIN PR. 1998. Neural Modulation of Gut Motility by Myomodulin Peptides and Acetylcholine in the Snail *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 79: 2460-74.
- PERUZZI E, FONTANA G, SONETTI D. 2004. Presence and role of nitric oxide in the central nervous of the freshwater snail *Planorbarius corneus*: possible implication in neuron-microglia communication. *Brain Res.* 1005: 9-20.

- PESCHEL M, STRAUB V, TEYKE T. 1996. Consequences of food attraction conditioning in *Helix*: a behavioral and electrophysiological study. *J. Comp. Physiol. A* 178: 317–27.
- PILKINGTON JB. 1981. Coordinated contractions of the anterior and posterior crop in *Amphibola crenata*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 69: 587-89.
- PILKINGTON JB. 1982. Electrically coupled stomatogastric neuron in the pulmonate snail, *Amphibola crenata*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 73: 395-99.
- PIN T, GOLA M. 1984. Axonal mapping of neurosecretory *Helix* bursting cells functional aspects of peripheral multibranching axons. *Comp. Biochem. Physiol. A* 79 (4): 611-20.
- PROSSER CL. 1991. *Comparative animal physiology. Neural and integrative animal physiology*. New York, Wiley-Liss, 776 p.
- PUNIN MY, ZAITSEVA OV. 2002. The first data on the intestine nervous system organization in priapulids. *Dokl. Biol. Sci.* 387: 559–61.
- PUNIN MY. 2001. The Gut Regulatory System of Invertebrates and Its Presumable Evolution in Multicellular Organisms: A Review, St. Petersburg.
- QUINLAN EM, MURPHY AD. 1991. Glutamate as a putative neurotransmitter in the buccal central pattern generator of *Helisoma trivolvis*. *J. Neurophysiol.* 66: 1264–71.
- QUINLAN EM, MURPHY AD. 1996. Plasticity in the multifunctional buccal central pattern generator of *Helisoma* illuminated by the identification of phase 3 interneurons. *J. Neurophysiol.* 75: 561–74.
- QUINLAN EM, ARNETT BC, MURPHY AD. 1997. Feeding stimulants activate an identified dopaminergic interneuron that induces the feeding motor program in *Helisoma*. *J. Neurophysiol.* 78: 812–24.
- QUINLAN EM, GREGORY K, MURPHY AD. 1995. An identified glutamatergic interneuron patterns feeding motor-activity via both excitation and inhibition. *J. Neurophysiol.* 73: 945–56.
- RANDALL D, BURGGREN W, FRENCH K. 2002. *Eckert Animal Physiology. Acquiring Energy: Feeding, Digestion, and Metabolism (cap15)*. WH Freeman.
- REHFELD JF. 1998. The new biology of gastrointestinal hormones. *Physiol. Rev.* 78: 1087–108.
- REINGOLD SC, GELPERIN A. 1980. Feeding motor programme in *Limax*. II. Modulation by sensory inputs in intact animals and isolated central nervous systems. *J. Exp. Biol.* 85: 1–20.
- RICHMOND JE, BULLOCH AM, BAUCE L, LUKOWIAK K. 1991. Evidence for the presence, synthesis, immunoreactivity and uptake of GABA in the nervous-system of the snail *Helisoma trivolvis*. *J. Comp. Neurol.* 307: 131–43.
- RICHMOND JE, MURPHY AD, LUKOWIAK K, BULLOCH AM. 1994. GABA regulates the buccal motor output of *Helisoma* by 2 pharmacologically distinct actions. *J. Comp. Physiol. A* 174: 593–600.
- RIGBY JE. 1963. Alimentary and reproductive systems of *Oxychilus cellarius* (Müller) (Stylomm.). *Proc. Zool. Soc. London.* 144:445-86.

- RIGHI G. 1964. Sobre o estômago de *Thais harmastoma*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 36(2): 189-91.
- RIGON P, DE CASTILHOS J, MOLINA CG, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2010. Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the young and adult land snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Tissue and Cell.* 42: 307–13
- RIGON P, DE CASTILHOS J, SAUR L, RODRIGUES MF, ACHAVAL M, XAVIER LL. 2009. NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus abbreviatus*: the involvement of pedal ganglia. *Invert. Neurosci.* 9 (3–4): 155–65.
- RIGON P, OLIVEIRA AH, FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 1998. Imunorreatividade à substância P no plexo pedioso do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus*. VII CONGRESSO IBERO-AMERICANO DE BIOLOGIA CELULAR. Montevideo, Uruguai.
- ROACH DK. 1968. Rhythmic muscular activity on the alimentary tract of the *Arion ater* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol.* 24: 865-78.
- ROBERTS PD. 1997. Classification of the rhythmic patterns in the stomatogastric ganglion. *Neurosci.* 81(1): 281-96.
- ROLDAN C, GARCIA-CORRALES P. 1988. Anatomy and histology of the alimentary tract of the snail *Theba pisana* (Gastropoda: Pulmonata). *Malacol.* 28(1-2): 119-30.
- ROSE RM, BENJAMIN PR. 1981. Interneuronal control of feeding in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. The interneuronal mechanism generating feeding cycles. *J. Exp. Biol.* 92: 203–228.
- ROSEN SC, MILLER MW, CROPPER EC, KUPFERMANN I. 2000a. Outputs of radula mechanoafferent neurons in *Aplysia* are modulated by motor neurons, interneurons and sensory neurons. *J. Neurophysiol.* 83: 1621–36.
- ROSEN SC, MILLER MW, EVANS CG, CROPPER EC, KUPFERMANN I. 2000b. Diverse synaptic connections between peptidergic radula mechanoafferent neurons and neurons in the feeding system of *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 83: 1605–20.
- ROSEN SC, TEYKE T, MILLER MW, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1991. Identification and characterization of cerebral-to-buccal interneurons implicated in the control of motor programs associated with feeding in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 11: 3630–55.
- ROSEN SC, WEISS KR, GOLDSTEIN RS, KUPFERMANN I. 1989. The role of a modulatory neuron in feeding and satiation in *Aplysia* – effects of lesioning of the serotonergic metacerebral cells. *J. Neurosci.* 9: 1562–78.
- RÖSZER T, JENEI Z, SERFÖZÖ Z, CZIMMERER Z, BÁNFALVI G. 2004a. Structural diversity of NADPH diaphorase-reactive enteral networks in Stylommatophora (Gastropoda, Pulmonata). *Invert. Biol.* 123 (2): 128-35.

- RÖSZER T, CZIMMERER Z, SZENTMIKLÓSI AJ, BÁNFALVI G. 2004b. Nitric oxide synthesis is blocked in the central nervous system during dormant periods of the snail *Helix lucorum*. *Cell Tissue Res.* 316, 255–62.
- RÖSZER T, KISS-TÓTH E, PETKÓ M, SZENTMIKLÓSI AJ, BÁNFALVI G. 2006. Phe-met-arg-phe (FMRF)-amide is a substrate source of NO synthase in the gastropod nervous system. *Cell Tissue Res.* 325: 567-75.
- RÖSZER T, KISS-TÓTH E, SZENTMIKLÓSI AJ, BÁNFALVI G. 2005. Seasonal periodicity of enteric nitric oxide synthesis and its regulation in the snail *Helix lucorum*. *Invert. Biol.* 124 (1): 18-26.
- RÖSZER T, JÓZSA T, SZENTMIKLÓSI AJ, BÁNFALVI G. 2009. Acetylcholine inhibits nitric oxide (NO) synthesis in the gastropod nervous system. *Cell Tissue Res.* 336: 325–35.
- RÓZSA KS. 1987. Organization of the multifunctional neural network regulating visceral organs in *Helix pomatia*. *Experimentia.* 43: 965-72.
- RUBEN PC, SWANN JW, CARPENTER DO. 1979. Neurotransmitter receptors on gill muscle fibers and the gill peripheral nerve plexus in *Aplysia*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57(10):1088-97.
- RÜHL A. 2005. Glial cells in the gut. *Neurogastroenterol Motil.* 17: 777-90.
- RUNHAM NW. 1975. Alimentary canal. In : Fretter V, Peake J. (eds): *Pulmonates*. V. 1. London, Academic Press. 53–104.
- RUNHAM NW, HUNTER PJ. 1970. *Terrestrial slugs*. London : Hutchinson University Library.
- RUSSELL L. 1929. The comparative morphology of the Elysoid and Aeolidioid types of the molluscan nervous system. *Proc. Zool. Soc.* 14: 197-233.
- S.-RÓZSA K, HERNÁD L, KEMENES GY. 1986. Selective *in vivo* labelling of serotonergic neurones by 5,6-dihydroxytryptamine in the snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 85: 419-25.
- S-RÓZSA K, ZHURAVLEV VL. 1981. Central regulation and coordination of activity of cardio-renal system and pneumostoma in subesophageal of the snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 69: 85-98.
- SADAMOTO H, HATAKEYAMA D, KOJIMA S, FUJITO Y, ITO E. 1998. Histochemical study on the relation between NO-generative neurons and central circuitry for feeding in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci Res.* 32 (1):57-63.
- SALIMOVA, NB, SAKHAROV, DA, MILOSEVIC, I, TURPAEV, TM, RAKIC, L. 1987. Monoamine-containing neurons in *Aplysia* brain. *Brain Res.* 400:285-299.
- SALVINI-PLAWEN LV. 1988. The structure and function of molluscan digestive systems. In: Wilbur KM. (ed) *The Mollusca*. New York. Academic Press. 11: 301–79.
- SANCHEZ JAD, KIRK M D. 2000. Short-term synaptic enhancement modulates ingestion motor programs of *Aplysia*. *J. Neurosci.* 20: RC85 (1–7).

- SANTAMA N, BRIERLEY M, BURKE JF, BENJAMIN PR. 1994. Neural network controlling feeding in *Lymnaea stagnalis*: immunocytochemical localization of myomodulin, small cardioactive peptide, buccalin, and FMRFamide-related peptides. *J. Comp. Neurol.* 342: 352-65
- SANTOS DE, LIU GJ, TAKEUCHI H, HASHIMOTO K, DEURA S. 1992. Further identification of giant neurons in the pedal ganglia of *Achatina fulica* Ferussac. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 102 (3): 373-77.
- SANTOS P, GHELEN G, FACCIONI-HEUSER MC, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2002. The distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta. Zool. Stockolm.* 83 (4): 345-51.
- SAWAYA P, PETERSEN JA. 1962. Sobre a ocorrência de Strophocheilidae (Mollusco, Gastropode) no Rio Grande do Sul. *Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. S. Paulo.* 262: 31-42.
- SCHMALZ E. 1914. Zur morphologie des nervensystems von *Helix pomatia*. *L. Z. Wiss. Zool.* 111: 506-68.
- SCHWARZ M, SUSSWEIN AJ. 1984. A neural pathway for learning that food is inedible in *Aplysia*. *Brain Res.* 294: 363-66.
- SCHWARZ M, SUSSWEIN AJ. 1986. Identification of the neural pathway for reinforcement of feeding when *Aplysia* learn that food is inedible. *J. Neurosci.* 6 (5): 1528-36.
- SCOTT MIH. 1939. Estudio anatomico del borus *Strophocheilus lorentzianus* (Döring) (Mollusca, Pulmonata). *Rev. Museo de La Plata, Sección de Zoología.* 1: 217-78.
- SELVERSTON AI, MOULINS M. 1987. *The Crustacean Stomatogastric System*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- SERFÖSÖ Z, SZENTMIKLÓSI AJ, ELEKES K. 2008. Characterization of nitric oxidergic neurons in the alimentary tract of the snail *Helix pomatia* L.: histochemical and physiological study. *J. Comp. Neurol.* 506: 801-21.
- SHIMIZU H, KOIZUMI O, FUJISAWA T. 2001. Three digestive movements in *Hydra* regulated by the diffuse nerve net in the body column. *J. Comp. Physiol. A.* 190: 623-30.
- SILVEIRA ABM, LEMOS EM, ADAD SJ, CORREIA-OLIVEIRA R, FURNESS JB, REIS DD'A. 2007. Megacolon in Chagas disease: a study of inflammatory cells, enteric nerves and glial cells. *Hum. Pathol.* 38: 1256-64.
- SKIEBE P. 2001. Neuropeptides are ubiquitous chemical mediators: using the stomatogastric nervous system as a model system. *J. Exp. Biol.* 204: 2035-48.
- SKIEBE P. 2003. Neuropeptides in the crayfish stomatogastric nervous system. *Microsc. Res. Techn.* 60 (3): 302-12.

- SKIEBE P, DIETEL C, SCHMIDT M. 1999. Immunocytochemical localization of FLRFamide-, proctolin-, and CCAP-like peptides in the stomatogastric nervous system and neurohemal structures of the crayfish, *Cherax destructor*. *J. Comp. Neurol.* 414: 511–32.
- SLADE CT, MILLS J, WINLOW W. 1981. The neuronal organisation of the paired pedal ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 69: 789-803.
- S-RÓZSA., K. 1984. The pharmacology of molluscan neurons. *Prog. Neurobiol.* 23: 79–150.
- S-ROZSA K. 1987. Organization of the multifunctional neural network regulating visceral organs in *Helix pomatia*. *Experimentia.* 43: 965-72
- STEFANELLI A. 1932a. Sul sistema nervoso intestinale dei *Limax* (cellule nervose con piú cilindri e circuito nervoso chiuso). *Arch. Ital. Anat. Embriol.* 30: 17–33.
- STEFANELLI A. 1932b. Circuito nervoso chiuso nel sistema nervoso viscerale dei *Limax*. *Boll. Zool.* 3: 153–58.
- STEFANELLI A. 1934a. Due chiari esempi di circuito nervoso chiuso. *Monit. Zool. Ital.* 45: 49–51.
- STEFANELLI A. 1934b. Nuove osservazione sul circuito nervoso chiuso in *Limax cinerea*. *Boll. Zool.* 5: 33 – 42.
- STERNBERGER LA. 1979. *Immunocytochemistry*. Chichester: John Wiley.
- STRAUB H, KUHLMANN D. 1984. Identification and quantitative measurements of biogenic monoamines in the central nervous tissue of some gastropods. *Comp. Biochem. Physiol. C* 78: 319-23.
- SUDLOW LC, JING J, MOROZ LL, GILLETTE R. 1998. Serotoninimmunoreactivity in the central nervous system of the marine molluscs *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*. *J. Comp. Neurol.* 395: 466–80.
- SUSSWEIN AJ, KUPFERMANN I. 1975a. Bulk as a stimulus for satiation in *Aplysia*. *Behav. Biol.* 13: 203–09.
- SUSSWEIN AJ, KUPFERMANN I. 1975b. Localization of bulk stimuli underlying satiation in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* 101: 309–28.
- SUSSWEIN AJ, KABOTYANSKI EA, HURWITZ I, SAKHAROV DA. 1993. Catecholaminergic neurons in the esophagus of *Aplysia*: A peripheral brain? *Soc. Neurosci. Abstr.* 19: 350.
- SUSSWEIN AJ, KUPFERMANN I, WEISS KR. 1976. The stimulus control of biting in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol.* 108: 75–96.
- SUSSWEIN AJ, ROSEN SC, GAPON S, KUPFERMANN, I. 1996. Characterization of buccal motor programs elicited by a cholinergic agonist applied to the cerebral ganglion of *Aplysia californica*. *J. Comp. Physiol. A* 179: 509–24.
- SUSSWEIN A J, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1984. Internal stimuli enhance feeding behavior in the mollusc *Aplysia*. *Behav. Neural Biol.* 41: 90–95.

- SWAROWSKY A, MONTEIRO AF, XAVIER LL, ZANCAN DM, ACHAVAL M. 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A* 14 (2): 230-38.
- SWENSEN AM, GOLOWASCH J, CHRISTIE AE, COLEMAN MJ, NUSBAUM MP, MARDER E. 2000. GABA and responses to GABA in the stomatogastric ganglion of the crab *Cancer borealis*. *J. Exp. Biol.* 203: 2075-92.
- SYED NI, BULOCH AGM, LUKOVIK K. 1990. *In vitro* reconstruction of respiratory central pattern generator of the mollusk *Lymnaea*. *Science*. 250: 282-85.
- SYED NI, HARRINSSON 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: 541-55.
- TAYLOR BE, LUKOWIAK K. 2000. The respiratory central pattern generator of *Lymnaea*: a model, measured and malleable. *Respir Physiol.* 122 (2-3): 197-207.
- TAZAKI K, SAKAI K. 1998. Neurotransmitters of motor neurons in the stomatogastric ganglion of an isopod crustacean, *Ligia exotica*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120: 579-86
- TELKES I, CSOKNYA M, BUZÁS P, GÁBRIEL R, HÁMORI J, ELEKES K. 1996. GABA immunoreactive neurons in the central and peripheral nervous system of the earthworm, *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Annelida). *Cell Tissue Res.* 285: 463-75.
- TEYKE T, ROSEN SC, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1993. Dopaminergic neuron B20 generates rhythmic neuronal activity in the feeding motor circuitry of *Aplysia*. *Brain Res.* 630: 226-237.
- THIEM H. 1917. Beiträge zur Anatomie und Phylogenie der Docoglossen. II. Die Anatomie und Phylogenie der Monobranchen (Akmäiden und Scurriden nach der Sammlung Plates) . *Jena. Z. Naturw.* 54: 405-630.
- THOMÉ JW. 1994. *Manual de aulas práticas de zoologia: Estudo morfo-anatômico de um molusco Mesuretra*. Porto Alegre, EDIPUCRS, Série zoologia 1: 32p.
- THOMÉ JW, SILVA AV, SANTOS DD. 1996. *Manual de aulas práticas de zoologia: Estudo morfo-anatômico de um molusco Sigmuretra*. Porto Alegre, EDIPUCRS, Série zoologia 2: 25p.
- TIERNEY AJ, BLANCK J, MERCIER J. 1997. FMRFamide-like peptides in the crayfish (*Procambarus clarki*) stomatogastric nervous system: Distribution and effects on the pyloric motor pattern. *J. Exp. Biol.* 200: 3221-33.
- TILLIER S. 1984. Patterns of digestive tract morphology in the limacisation of helicarionid, succineid, and athoracophorid snails and slugs (Mollusca: Pulmonata) . *Malacol.* 25: 173-92.
- TILLIER S. 1989. Comparative morphology, phylogeny and classification of land snails e slugs (*Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora*). *Malacol.* 30(1-2): 1-303.

- TRIEBSKORN R. 1989. Ultrastructural changes in the digestive tract of *Deroceras reticulatum* (Müller) induced by carbamate molluscicide and by metaldehyde. *Malacol.* 31(1): 141-56.
- TRIMBLE DL, BARKER DL, BALLARD BJ. 1984. Dopamine in a molluscan nervous system: synthesis and fluorescence histochemistry. *J Neurobiol.* 15: 27-36.
- TUERSLEY MD, MCCROHAN CR. 1988) Serotonergic modulation of patterned motor output in *Lymnaea stagnalis*. *J. Exp. Biol.* 135: 473-86.
- VAN NOORDEN S, FRITSCH HAR, GRILLO TAI, POLAK JM, PEARSE AGE. 1980. Immunocytochemical staining for vertebrate peptides in the nervous system of a gastropod mollusc. *Gen. Comp. Endocrino.* 140: 375-76.
- VEHOVSZKY A, ELEKES K. 1985. Electrophysiological characteristics of peripheral neurons and their synaptic connections in the intestinal nerve of *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol. A* 82 (2): 345-53.
- VEHOVSZKY A, ELLIOTT CJH. 1995. The hybrid modulatory/pattern generating N1L interneuron in the buccal feeding system of *Lymnaea* is cholinergic. *Invert. Neurosci.* 1: 67-74.
- VEHOVSZKY A, ELLIOTT CJH. 2001. Activation and reconfiguration of fictive feeding by the octopamine-containing modulatory OC interneurons in the snail *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 86: 792-808.
- VEHOVSZKY A, ELLIOTT CJH, VORONEZHSKAYA EE, HIRIPI L, ELEKES K. 1998. Octopamine: A new feeding modulator in *Lymnaea*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1631-43.
- VERNADAKIS A, ROOTS BI. 1995. *Neuron-glia interrelation during Phylogeny: Phylogeny and Ontogeny of glial cells*. Humana Press, Totowa, NJ.
- VOLTZOW J. 1997. Gastropoda: Prosobranchia. In: Harrison FW, Kohn AJ. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Wiley-Liss, Inc., New York. V. 6A: Mollusca, p. 111-252.
- WALKER G. 1972. The digestive system of the slug, *Agriolimax reticulatus* (Müller): experiments on phagocytosis and nutrient absorption. *Proc. Malac. Soc. London.* 40: 33-43.
- WARD SM, XUE C, SHUTTLEWORTH, CW, BREDT DS, SNYDER SH, SANDERS KM. 1992. NADPH diaphorase and nitric oxide synthase colocalization in enteric neurons of canine proximal colon. *Am. J. Physiol.* 263 (2 Pt 1): G277-84.
- WEIMBERG RJ, VALTSCHANOFF JG, SCHIMIDT HHHW. 1996. The NADPH diaphorase histochemical stain. In: Feelisch M, Stamler JS. *Methods in Nitric Oxide Research*. John Willey & Sons Ltd., cap. 16, p. 237-48.
- WEISS KR, BREZINA V, CROPPER FC, HOOPER SL, MILLER MB, PROBSI WC, VILIM FS, KUPPERMANN I. 1992. Peptidergic co-transmission in *Aplysia*: functional implications for rhythmic behaviors. *Experientia.* 48: 456-63.

- WINLOW W, BENJAMIN PR. 1976. Postsynaptic effects of a multiaction giant interneurone on identified snail neurones. *Nature Lond.* 268: 263-65.
- WONG RG, MARTEL EC, KATER SB. 1983. Conditioning factor(s) produced by several molluscan species promote neurite outgrowth in cellular culture. *J. Exp. Biol.* 105: 389-93.
- XIN Y, WEISS KR, KUPFERMANN I. 1996. An identified interneuron contributes to aspects of six different behaviors in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 16(16): 5266-79.
- XIN Y, KOESTER J, JING J, WEISS KR, KUPFERMANN I. 2001. Cerebral-abdominal interganglionic coordinating neurons in *Aplysia*. *J. Neurophysiol.* 85: 174– 86.
- YEOMAN MS, BRIERLEY MJ, BENJAMIN PR. 1996. Central pattern generator interneurons are targets for the modulatory serotonergic cerebral giant-cells in the feeding system of *Lymnaea*. *J. Neurophysiol.* 75: 11–25.
- YEOMAN MS, KEMENES G, BENJAMIN PR, ELLIOTT CJH. 1994a. Modulatory role for the serotonergic cerebral giant-cells in the feeding system of the snail, *Lymnaea*. II. Photoinactivation. *J. Neurophysiol.* 72: 1372–82.
- YEOMAN MS, PIENEMAN AW, FERGUSON GP, TERMAAT A, BENJAMIN PR. 1994b. Modulatory role for the serotonergic cerebral giant-cells in the feeding system of the snail, *Lymnaea*. I. Fine wire recording in the intact animal and pharmacology. *J. Neurophysiol.* 72: 1357–71.
- YOUNG HM, FURNESS JB, SEWELL P, BURCHER EF, KANDIAH CJ. 1993. Total numbers of neurons in myenteric ganglia of the guinea-pig small intestine. *Cell Tissue Res.* 272: 197– 200.
- YOSHIDA M, KOBAYASHI M. 1991. Neural control of the buccal muscle movement in the African giant snail *Achatina fulica*. *J. Exp. Biol.* 155: 415–33.
- ZAITSEVA OV, MARKOSOVA TG. 2008. Acetylcholine, Nitric Oxide and Their Possible Colocalization in Regulatory Cells of the Digestive System of Gastropods. *Doklady Bio. Sci.* 421: 248–50.
- ZAITSEVA OV, KUZNETSOVA TV, MARKOSOVA TG. 2009. NADPH-Diaphorase Activity in the Digestive System of Gastropod Molluscs *Achatina fulica* and *Littorina littorea*. *J Evol Biochem Physiol.* 45(1): 125-37.
- ZAITSEVA OV, KUZNETSOVA TV. 2008 Distribution of acetylcholinesterase activity in the digestive system of the gastropod molluscs *Littorina littorea* and *Achatina fulica*. *Morfologija* 133 (1): 55-9.
- ZAITSEVA OV. 2006. Nerve cells in the digestive tract epithelium of gastropods. *Doklady Biol. Sci.* 408: 220-22.
- ZAITSEVA OV, FILIMONOVA SA, 2006. Ultrastructure of Neural Cells and Neural Plexuses of the Digestive Tract in Gastropod Molluscs. *Dokl. RAN.* 409: 280-82.

- ZANCAN DM, BRAUER M, ACHAVAL M. 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp. Biochem. Physiol. A* 118 (3): 765-72.
- ZANCAN DM, NÓBLEGA HG, SEVERINO AG, 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 DM, ACHAVAL M. 1995. Morphology of the dorsal body of the pulmonate mollusk *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) and its seasonal variations. *Rev. Brasil. Biol.* 55 (1): 1-11.
- ZANCAN DM. 1996. Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus*. Porto Alegre, 379 p. [Tese de doutorado apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia, UFRGS].
- ZHURAVLEV V, BYCHOKOV R, KADIROV S, DIAKOV A, SAFONOVA T. 1997. Cardioexcitatory neurons in the snail *Achatina fulica*. *J. Brain Res.* 38: 279-90.
- ZHURAVLEV V, SAFONOVA T, BUGAJ V, KODIROV S. 2002. Mechanismc of viscerocardial reflexes in land pulmonate mollusc, *Achatina fulica* F. *Zool Polonai.* 47 (3-4): 5-19.

ANEXO I

Decision Letter (ZS-O-2012-0170.R1)

From: bothrops@sci.ehime-u.ac.jp

To: zancan@ufrgs.br

CC:

Subject: Zoological Science - Decision on Manuscript ID ZS-O-2012-0170.R1

Body: @ @date to be populated upon sending@ @

Dear Dr. Zancan:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "General morphology and innervation of the midgut and hindgut of *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata)" for publication in Zoological Science.

* ATTENTION!! *

If you submitted low-resolution illustration files for reviewing purposes only, please send your high-resolution illustration files for printing, via e-mail attachment (or files saved on a CD-ROM, via postal mail) to the ZS Editorial Office at: e-mail zs-office@umin.net

Postal address:

ZS Editorial Office

Hongo MT Bldg. 4F, 7-2-2,

Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

If you ask for the replacement of illustrations at the time of proofreading, this may cause a delay in publication, and you may be charged for extra costs. Original Articles of up to eight printed pages or Review Articles and Essays of up to 15 printed pages will be published free of charge. For pages over the limits, the charge will be JPY 5,000 per page. Color illustrations will be charged separately.

Your manuscript will be sent to the copyeditor, as well as to the printer. You will receive page proofs, along with the copyedited manuscript, from the Editorial Office, which may take a while.

*****Potential Cover page Photo submission*****

If you wish to submit a photograph, line drawing, or composite illustration for consideration as a cover illustration, please send the electronic file by e-mail attachment (or if too large, by CD-R). If the illustration submitted for consideration is not your own work, you are responsible for obtaining written permission from the copyright owner. A cover illustration does not have to be a figure from your manuscript; any interesting and striking illustration related to your manuscript (at any level of biological organization from sub-cellular to

whole organism or even community) can be considered.

The Editor-in-Chief will choose one among all the illustrations submitted for consideration for the cover of a particular issue; hence, we do not guarantee that the cover art you submit will be utilized.

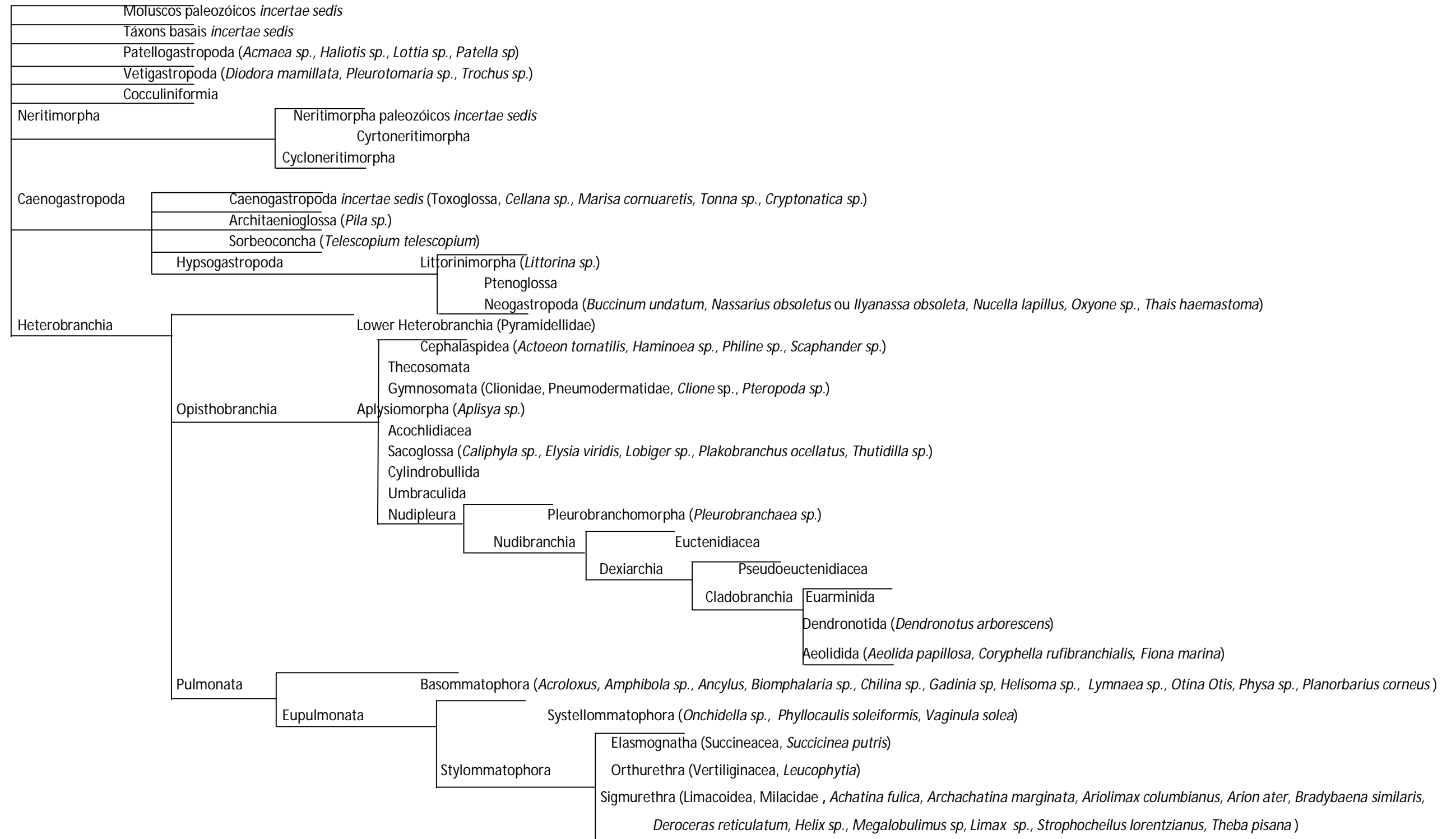
Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Zoological Science, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Yasunori Murakami
Reviewing Editor, Zoological Science
bothrops@sci.ehime-u.ac.jp

Date Sent: 16-Nov-2012

ANEXO II

Bouchet & Rocroi, 2005 é atualmente o principal sistema de classificação de gastrópodes utilizado por especialistas. Este sistema taxonômico foi apresentado em um artigo chamado "*Classification and Nomenclator of Gastropod Families*" publicado no jornal *Malacologia* em 2005 escrito em colaboração com J. Frýda, B. Hausdorf, W. Ponder, Á. Valdés e A. Warén. Taxonomia em formato de cladograma:



Bouchet P, Rocroi J-P. 2005. Classification and nomenclator of gastropod families. *Malacologia: Intern. J. Malacol.* 47(1-2). ConchBooks: Hackenheim, Germany. ISBN 3-925919-72-4. Issn = 0076-2997. 397 pp. <http://www.vliz.be/Vmdcdata/imis2/ref.php?refid=78278>