

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

UM MODELO DE COMPORTAMENTO AVERSIVO TÉRMICO EM *Megalobulimus oblongus* E A AÇÃO DE FÁRMACOS NOS SISTEMAS OPIÓIDE E SEROTONINÉRGICO ENVOLVIDOS NA NOCICEPÇÃO

Marco Aurélio Pereira Penha

ORIENTADORES: Profa. Dra. Matilde Achaval Elena
Profa. Dra. Denise M. Zancan

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre
2001

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar esta parte do meu trabalho agradecendo, primeiramente a Deus, razão de tudo o que existe;

Aos meus pais, por me presentarem com a vida e com as ferramentas de caráter necessárias para tornar-me digno de exercê-la;

A minha esposa Giane e ao meu filho Leonardo, por me ensinarem o significado do amor e da dedicação;

Aos Profs. Dra. Matilde Achaval, Denise Zancan pelos **cinco Cs**: carinho, conselhos, conhecimento, compreensão e camaradagem;

Aos Profs. Dr. Oswaldo W. Dick, Léder Xavier, Juarez A. Schmidt e Alexandre Rieger, pelo apoio, sabedoria e amizade que nunca me faltaram;

Aos funcionários, colegas e amigos do Laboratório de Histofisiologia Comparada-UFRGS, DML/SCS, Depto. Biologia-UNISC e Hospital Santa Cruz: Alberto Rasia-Filho, Cristina Faccioni-Heuser, Gabriel Nóbrega, Luciano, Alessandra, Irmã Evanir, Thais, Giordano, Flávia, Alice, Cristina Moriguchi, Karen, Paula, Nara, Cláudia Günther, Dr. Bruno Schinke, Eudira, Maria Lorini, Sr. Ildeu Sisnande e todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização dessa tarefa.

“O homem não passa de uma gota... mas uma gota muito presunçosa”

(A. Adler)

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
INTRODUÇÃO	4
1 Abordagem comparativa em neurobiologia comportamental	5
2 Dor e nocicepção	12
2.1 Diferenças conceituais	12
2.2 Níveis e mecanismos regulatórios	18
3 Sistema opióide	19
4 Sistema serotoninérgico	26
5 Sistemas opióide e serotoninérgico nos invertebrados	30
5.1 Sistema opióide	30
5.2 Sistema serotoninérgico	33
6 Estudo da nocicepção em modelos experimentais e a utilização de modelos não-mamíferos	35
OBJETIVOS	41
MATERIAL E MÉTODOS	43
1 Animais: procedência, manutenção e características	44
2 Estímulo nociceptivo	45
2.1 Estímulo aversivo térmico	45
2.3 Determinação da latência	47
3 Tratamento com fármacos que atuam nos sistemas opióide e serotoninérgico	48
3.1 Sistema opióide	48
3.1.1 Sulfato de morfina	48
3.1.2 Cloridrato de naloxone	49
3.2 Sistema serotoninérgico	50
3.2.1 Hidrocloridrato de 5-hidróxi-triptamina	50

3.2.2 Maleato de metisergida	51
3.2.2.1 Metisergida + serotonina	51
3.2.2.2 Metisergida + salina	52
4 Análise estatística	52
RESULTADOS	54
1 Comportamento aversivo térmico	55
1.1 Animais colocados na placa a temperatura ambiente	55
1.2 Animais colocados na placa quente a 45 ⁰ C e 50 ⁰ C	55
2 Experimentos com fármacos	58
2.1 Animais tratados com sulfato de morfina	58
2.2 Animais tratados com cloridrato de naloxone	59
2.3 Animais tratados com hidrocloreto de serotonina	59
2.4 Animais tratados com maleato de metisergida	61
2.4.1 Animais tratados com metisergida + serotonina	62
2.4.2 Animais tratados com metisergida + salina	63
DISCUSSÃO	70
1 Estímulo aversivo térmico e determinação da latência	71
2 Estudos farmacológicos	74
2.1 Sistema opióide	74
2.2 Sistema serotoninérgico	78
CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

RESUMO

As manifestações comportamentais em *Megalobulimus oblongus* após a estimulação aversiva térmica (EAT) e a ação de fármacos que atuam sobre os sistemas opióide e serotoninérgico foram analisadas, empregando-se, respectivamente, testes com placa aquecida, morfina, serotonina (5-hidróxi-triptamina ou 5-HT), e dos bloqueadores, o naloxone e a metisergida.

Com o procedimento utilizado, foi possível diferenciar um comportamento estereotipado indicativo de resposta à nocicepção, determinar a latência em que tais comportamentos são inicialmente manifestados, e as alterações obtidas mediante o emprego de fármacos.

A morfina foi capaz de aumentar a latência demonstrando uma ação anti-nociceptiva neste modelo, que foi antagonizado pelo naloxone. No tocante ao sistema serotoninérgico, tanto a 5-HT quanto a metisergida aplicadas isoladamente, provocaram uma diminuição da latência que foi relacionado com um efeito nociceptivo. Porém, quando estes dois fármacos foram aplicados conjuntamente, observou-se um efeito contrário.

Os resultados obtidos neste estudo farmacológico com o *M. oblongus* são congruentes com estudos prévios realizados em outros modelos gastrópodos, citados na literatura, e sugerem o envolvimento de um sistema opióide e serotoninérgico nas respostas reflexas nociceptivas neste animal, sendo estas manifestadas por intermédio de um comportamento motor aversivo. Além disso, ficou demonstrada a presença de receptores de ambos os sistemas, conforme a ação dos fármacos empregados.

ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina

ACTH – Hormônio Adreno-Córtico-Trófico

ADH – Hormônio Anti-Diurético (vasopressina)

ASP – Aspartato

BK – Bradicinina

CCK – Colecistoquinina

CGRP – Peptídeo Relacionado com o Gene da Calcitonina

CK (s) – Citoquinas

CRH - Hormônio Liberador de Corticotrofina

DYN – Dinorfina

EAT – Estímulo Aversivo Térmico

FAD – Flavina-Adenina-Dinucleotídeo

GABA – Ácido Gama-Amino-Butírico

GLU – Glutamato

GLY – Glicina

Ig (s) – Imunoglobulina(s)

ILK(s) – Interleucina(s)

Leu-Enk – Leucina-Encefalina

MAO – Mono-Amino-Oxidase

Met-Enk – Metionina-Encefalina

β -MSH – Hormônio Melanócito-Estimulante (fração β)

NH(s) – Neurohormônio(s)

NMDA – N-Metil-D-Aspartato

NMed(s) – Neuromediador(es)

NMod(s) – Neuromodulador(es)

NT(s) – Neurotransmissor(es)

5-HT – 5-Hidroxitriptamina

Nor – Noradrenalina

PG(s) – Prostaglandina(s)

PK(s) – Proteinoquinase(s)

POMC – Pró-Ópio-Melano-Cortina

PP – Peptídeo Pancreático

RIE – Radioimunoensaio

SE – Sistema Endócrino

SI – Sistema Imune

SN – Sistema Nervoso

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SP – Substância P

TGI – Trato Gastro-Intestinal

TK(s) – Taquiquininas

VIP – Peptídeo Vaso-Intestinal

INTRODUÇÃO

1 ABORDAGEM COMPARATIVA EM NEUROBIOLOGIA COMPORTAMENTAL

Todos os organismos vivos apresentam extensa correspondência na estrutura de seus componentes moleculares e processos químicos ativos. Uma parte desta similaridade química pode sustentar-se no fato de que “somente assim a vida é possível”. Existem diferentes disciplinas biológicas que utilizam a abordagem comparativa, cada uma com seus objetivos e métodos particulares. A mais antiga, a taxonomia, relacionada com a classificação das espécies, originou-se com Aristóteles (384 - 322 a.C.), tendo representação mais importante com os trabalhos de Carolus Linnaeus (1707 – 1778). Outra disciplina, a anatomia comparada, que estuda as estruturas internas e externas dos animais, teve sua origem na medicina, analisando-se órgãos de animais e de humanos. O termo “anatomia comparada” foi criado pelo médico Nehemiah Grew em 1675. Desde Cuvier (1769 – 1832), tornou-se objeto da biologia, consolidando-se principalmente no século XIX. Com a distinção entre “homologia” e “analogia”, surgiu uma das mais importantes ferramentas para a análise filogenética. A fisiologia comparada, também originária da medicina, surgiu em decorrência do uso de modelos animais, pois alguns experimentos são inviáveis em seres humanos. A extrapolação de resultados obtidos em animais para situações humanas é assegurado pelo crescente reconhecimento da validade universal das regras básicas da fisiologia geral. Mesmo entre organismos tão diferentes como bactérias e mamíferos, existem certo grau de similaridade ao nível molecular que não pode ser satisfatoriamente explicado, seja por necessidade funcional ou mudanças. Isto fica bem claro quando comparamos ácidos nucleicos e seqüências de proteínas. A homologia apresentada nas

macromoléculas que carregam informações é a mais forte evidência de uma origem comum para todos os seres vivos (URICH, 1994).

O “valor explanatório” ou “validade heurística” é definido como a habilidade para explicar e simplificar sistemas complexos (GERLOFF, 1997). O comportamento, embora muito complexo, pode ser investigado como qualquer fenômeno observável. A análise científica do comportamento começa pelo isolamento das partes simples de um evento complexo de modo que esta parte possa ser melhor compreendida (FADIMAN & FRAGER, 1986). Além disso, o comportamento pode ser estudado direta ou indiretamente, seja pela observação do fenômeno em si, seja através de sinais e vestígios característicos deixados pelo fenômeno.

Uma série de evidências apontam para uma continuidade filogenética na expressão e na regulação de comportamentos fundamentais com valor de sobrevivência (BOWLBY, 1984; KAVALIERS, 1989). A idéia de que trabalhar com estudos sobre animais pode ser relevante para a compreensão do comportamento humano é um resultado indireto da pesquisa iniciada por Darwin em 1872, e do subsequente desenvolvimento das teorias da evolução. Os primeiros pesquisadores de comportamentos animais estavam interessados em descobrir as capacidades de raciocínio destes. Darwin foi um dos primeiros a reconhecer os aspectos biológicos do comportamento, ao examinar e explicar a manifestação das expressões sob o ponto de vista de sua funcionalidade, no processo de adaptação ao meio, defendendo, ainda, que algumas de nossas expressões são resquícios herdados de antepassados primitivos, comuns tanto ao homem quanto a outros animais (BOWLBY, 1984; FADIMAN & FRAGER, 1986; DARWIN, 1998).

A observação mais cuidadosa dos diferentes sistemas biológicos que nos cercam, mostra-nos que, em cada um deles e conforme as suas peculiaridades, existem mecanismos adequadamente desenvolvidos visando a modulação de variações ambientais, sendo uma condição *sine qua non* à sobrevivência de todo ser vivo. Além da capacidade de reconhecimento, traduzida na percepção de estímulos; outras duas propriedades são consideradas fundamentais para a integridade do indivíduo. Uma delas é a condução dos estímulos até determinados pontos do organismo, nos quais ocorre o gerenciamento das informações recebidas, bem como a elaboração de respostas apropriadas; outra propriedade, é a expressão destas respostas através de diversos sistemas efetores. Segundo Machado (1998), essas propriedades são consideradas fundamentais para o protoplasma.

Enquanto os sistemas sensoriais fornecem uma representação contínua do mundo exterior de modo que faça sentido para o organismo, o sistema somatossensorial informa o SNC a respeito dos estados internos e externos do corpo, servindo tanto para funções sensoriais quanto motoras (NOBACK *et al.*, 1999).

Uma das atribuições do sistema sensorial, a exterocepção, inclui as sensações de toque, temperatura e dor, podendo ser dividida em termocepção, mecanocepção e nocicepção. Cada uma destas modalidades pode ser dividida, ainda, em submodalidades, cujas características envolvem a ativação de um único tipo de axônio sensorial primário. Muitos aspectos da seletividade de cada receptor para uma submodalidade sensorial em particular deve-se a sua estrutura (STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000).

Em uma visão reducionista, o comportamento pode ser definido como a geração de seqüências de movimentos. Para os organismos obterem uma vantagem seletiva, contudo, necessitam não somente fazer o que é certo no tempo certo, mas também devem manifestar respostas eficientemente, isto é, com uma velocidade ótima e gasto energético mínimo. Uma das maneiras mais importantes através da qual a eficácia comportamental é testada é pela modulação das respostas baseadas nos “estados internos”. Subjetivamente, os seres humanos reconhecem tais estados usando termos como fome, sede ou atividade sexual. Os psicólogos muitas vezes referem-se a estes estados como “motivacionais” ou “estados dirigidos”. Em animais, nos quais não temos a verbalização, os “estados internos” podem ser inferidos a partir da observação que os comportamentos tendem a ocorrer em padrões características que servem para promover a obtenção de algum objetivo, tal como alimento, água ou um parceiro. Os “estados dirigidos” também servem para explicar uma variedade de outros fenômenos comportamentais incluindo persistência de um comportamento específico após o término do estímulo iniciador, coordenação entre comportamentos e atenção seletiva. Os “estados comportamentais” parecem assegurar que os recursos do organismo sejam direcionados para um objetivo em particular em um determinado tempo. Em alguns casos, diferentes comportamentos interferem fisicamente uns com os outros, porque utilizam os mesmos músculos ou membros, ou então produzem efeitos competitivos; os comportamentos também podem interferir uns com os outros porque necessitam usar os limitados recursos computacionais do SN (KUPFERMANN *et al.*, 1991).

Em organismos complexos, o comportamento pode ser entendido como o produto da atividade integrada de um conjunto de sistemas cerebrais interatuantes. Dentre estes sistemas, encontram-se mecanismos que monitorizam estímulos

sensoriais internos e externos, foco e manutenção da atenção para um estímulo significativo, e ativação de outras regiões cerebrais envolvidas em respostas comportamentais “padrão”. A ativação de sistemas cerebrais motivacionais pode ser acompanhada pela eliciação de respostas viscerais e endócrinas. Os sistemas afetivos ou relacionados com o humor também influenciam a intensidade e a qualidade das respostas comportamentais e, em animais superiores e seres humanos, geram um conjunto de experiências conhecidas como “emoção” (PEDERSEN *et al.*, 1998).

Uma característica fundamental do comportamento é sua plasticidade. Já está bem estabelecido que o estado comportamental de um animal é regulado por múltiplos mecanismos celulares operando em vários níveis do sistema nervoso. Sob influência de estímulos idênticos, a resposta de um organismo pode variar acentuadamente em períodos diferentes. A plasticidade é controlada por, pelo menos, quatro tipos de variáveis: aprendizado, mudanças relacionadas com o desenvolvimento, doença ou lesão e estado motivacional (BLOMM, 1988; KUPFERMANN *et al.*, 1991; LEONARD *et al.*, 1990; BEN-ARI, 1995; LISBERGER, 1995).

Por outro lado, dentre os mais recentes avanços no campo da comunicação intercelular, situa-se a efetiva interação entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico, bem como a íntima relação química entre os “mensageiros” utilizados por estes sistemas. A interação entre os sistemas imunitário e neuro-endócrino vem sendo proposta a partir da constatação de que os neuropeptídeos modulam diretamente a afinidade de células imunitárias, e que as citocinas produzidas no SN de mamíferos também são encontradas em invertebrados (LEUNG & STEFANO,

1987; STEFANO *et al.*, 1988; KAVALIERS, 1989; RENZELLI-CAIN & KALOUSTIAN, 1995; OTTAVIANI & FRANCESCHI, 1996; CLATWORTHY, 1996).

Nos últimos anos, o interesse pela neuromodulação comportamental tem aumentado de forma dramática; tornou-se evidente que substâncias como neuropeptídeos e monoaminas estão envolvidos na comunicação sináptica, modulando os processos de transmissão. A descrição dos efeitos de um neuromodulador, vai desde alterações específicas de membrana e da atividade neuronal, até modificações em todo o comportamento do animal. De um modo geral, a neuromodulação descreve um processo de transmissão multi-facetada, envolvendo grupos de neurônios (ex.: redes neuronais, geradores centrais de padrão), a expressão integrada de respostas comportamentais, e a habilidade para responder e acomodar vários estímulos internos e mudanças ambientais externas. Embora originalmente só as monoaminas e neuropeptídeos tenham sido considerados neuromoduladores, tornou-se evidente a participação de uma gama de outros agentes neuroativos, incluindo purinas, esteróides, e lipídios - produtos derivados do ácido aracídico (AA) tais como prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LEUNG & STEFANO, 1987; MCGINTY & BLOMM, 1983; BLOMM, 1988; KAVALIERS, 1989; OTTAVIANI & FRANCCHI, 1996; PEDERSEN *et al.*, 1998).

A figura 1 representa um esquema gráfico dos níveis modulatórios subjacentes a expressão de comportamentos, inclusive os denominados “complexos”, relacionados com as funções mentais superiores tais como abstração, cognição e julgamento.

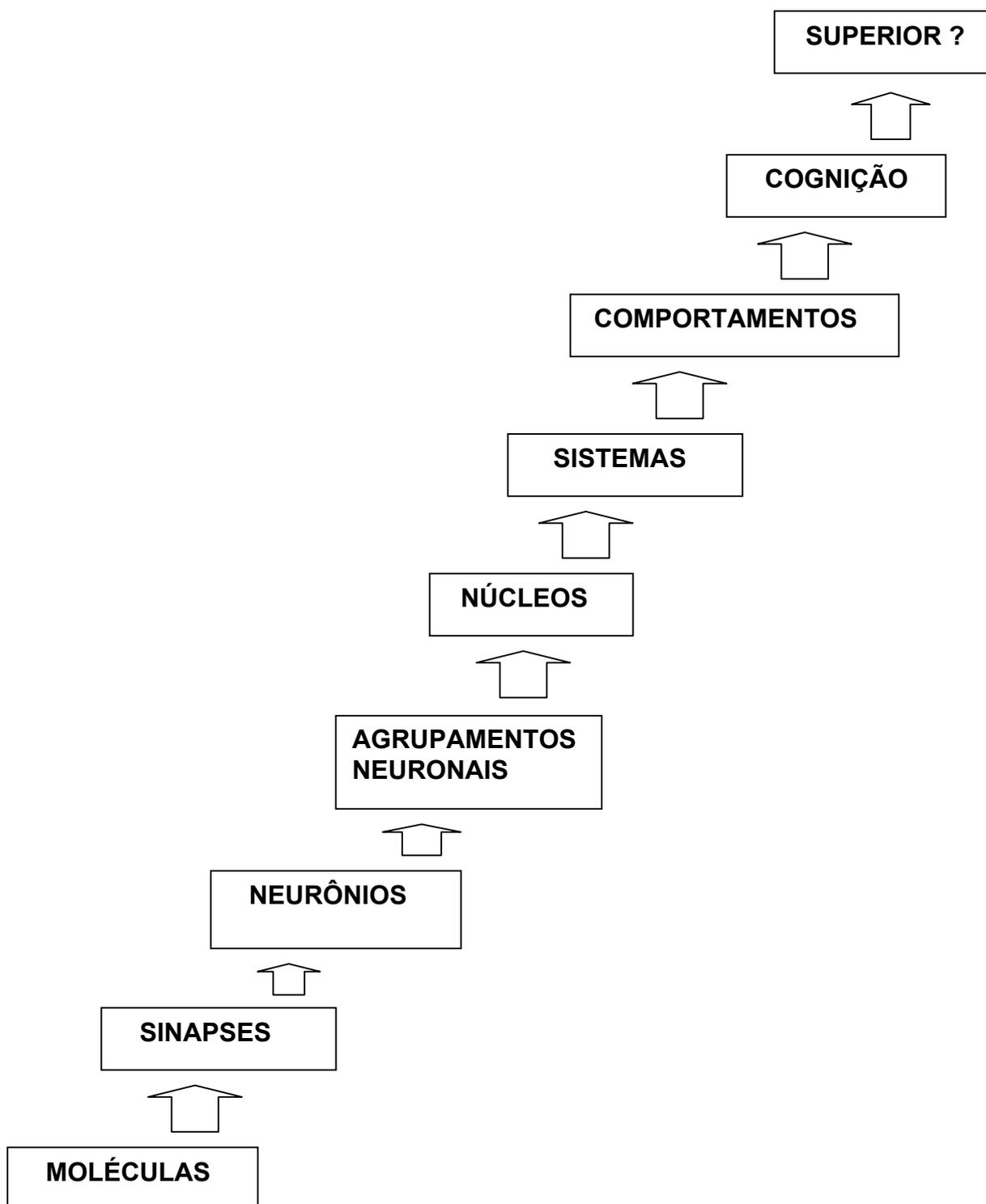


Fig. 1: Esquema de uma organização hierárquica vertical dos circuitos neurais envolvidos no funcionamento de um determinado NT ou Nmod, desde o nível molecular até a regulação de eventos comportamentais complexos (modificado de Blomm, 1988).

2 DOR E NOCICEPÇÃO

2.1 DIFERENÇAS CONCEITUAIS

A distinção entre nocicepção e dor é fundamental para um entender adequadamente os sistemas sensoriais envolvidos nestes fenômenos, tanto clínica quanto experimentalmente. Conforme a definição da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) “...a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou em potencial, ou descrita nos termos de tal dano” (CASEY & DUBNER, 1989; WANNAMACHER & FERREIRA, 1998; BASBAUM & JESSEL, 2000). Em seres humanos, aos quais melhor aplica-se o termo, a dor é uma experiência multifacetada em que a nocicepção representa apenas um dos seus componentes, o sensorial. As vias neurais e os mecanismos que mediam este componente discriminativo da dor é ativado unicamente por aferências nociceptivas somáticas e viscerais. Os componentes afetivos, cognitivos e motivacionais relacionados à dor também são ativados por aferências nociceptivas. Contudo, estes componentes podem ser ativados não somente por estímulos nociceptivos, mas por outros além da dor. As percepções como a dor são manifestações abstratas da entrada de estímulos sensoriais no SNC. Diz-se que a dor é uma percepção subjetiva com dimensão psicológica. Um estímulo nocivo que desencadeia a resposta de um nociceptor não é necessariamente percebido como dor. A percepção é um produto da abstração cerebral e da elaboração de estímulos sensoriais (LEVINE *et al.*, 1980; CASEY & DUBNER, 1989; NOBACK *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000; BEAR *et al.*, 2001).

A dor é influenciada por uma série de elementos subjetivos, e que não podem ser medidos, incluindo nível de atenção, estado emocional, personalidade e experiências prévias. A dor pode, simultaneamente, servir como sintoma e como defesa contra o estresse psicológico. Os fatores psicológicos podem fazer com que o indivíduo torne-se preocupado com o corpo e aumente as sensações até mesmo “normais”, como por exemplo, nos casos de dor crônica. Os pacientes podem ser excessivamente responsivos à dor, devido a ganhos secundários pessoais, sociais e financeiros. A dor crônica pode representar um meio de justificar a incapacidade de estabelecer relacionamentos sociais. Afiliações culturais, étnicas ou religiosas podem influenciar o grau e a maneira pela qual os indivíduos expressam a dor e o modo como suas famílias reagem aos sintomas (KAPLAN *et al.*, 1997; COLE *et al.*, 1998; WANNAMACHER & FERREIRA, 1998).

A função de alerta da dor aguda é melhor observada na pele quando exposta a um dano externo. A dor cutânea aguda provoca reflexos motores de retirada ou reações de fuga, descontinuando a exposição ao estímulo nocivo, cessando a percepção dolorosa. Além disso, sob certas circunstâncias, a dor aguda ou mesmo o tratamento desta pode levar à ativação comportamental generalizada, respostas endócrinas como, por exemplo, secreção de corticosterona, e aumento da atividade simpática. As dores visceral ou somática profundas, quando severas, também podem provocar modificações comportamentais tipo reação de quiescência, desinteresse, hiporeatividade, hipotermia e bradicardia (MILLAN, 1986; WIETERLAK *et al.*, 1994c; TRAUB, 1997).

Como uma das modalidades somato-sensoriais, o reconhecimento e a resposta à estímulos ambientais aversivos, é uma característica básica presente em todos os animais definida como “nocicepção” (latim, *nocere*), e representa um

processamento do SNC e SNP que extrai as características sensoriais de estímulos que são real ou potencialmente danosos aos tecidos. Estas características incluem intensidade, localização, qualidade e duração de um estímulo nocivo (MILLAN, 1998; NOBACK *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000).

Para realizar essa tarefa, a pesquisa neurofisiológica mais recente estabeleceu que é necessária a existência de nervos aferentes primários específicos para a sinalização de estímulos nocivos, os nociceptores, que detectam a natureza do estímulo, bem como de efetores, que respondem aos estímulos sensoriais, levando à produção de comportamentos específicos. Estes são ativados por alguma forma de energia (mecânica, térmica ou química), convertendo essa energia em impulsos elétricos que são conduzidos desde a periferia até os níveis superiores do SNC. Os nociceptores caracterizam-se por um alto limiar para todos os estímulos, exceto os nocivos, quando comparados com outros receptores, e pelo aumento progressivo da resposta a estímulos nociceptivos repetidos ou crescentes (“sensibilização”). Este fenômeno foi primeiramente descrito em detalhes nos nociceptores polimodais não-mielinizados de gatos por Bessou e Perl (1969) caracterizada pela diminuição do limiar para temperatura, pelo aumento na responsividade a estímulos supralimiáres manifestada através da diminuição da latência, do maior número de impulsos ou de ambos, pelo desenvolvimento de uma descarga espontânea de baixa frequência, e pela pós-descarga, eventualmente (MILLAN, 1998; NOBACK *et al.*, 1999; STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000).

É interessante frisar que a sensibilização por estímulo térmico nos nociceptores mecânicos mielinizados não é acompanhada por respostas alteradas à estímulos mecânicos (CAMPBELL *et al.*, 1979; STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM &

JESSEL, 2000). Estudos paramétricos detalhados dos efeitos obtidos com estímulo térmico repetido indicam que a sensibilização é somente uma possível consequência, variando amplamente. Um aumento ou diminuição na respostas observadas, podem ocorrer dependendo do tipo de nociceptor, da intensidade e da duração do estímulo, do intervalo de tempo entre os estímulos, e da espécie estudada (MEYER & CAMPBELL, 1981; DUBNER & BENNETT, 1983; KATAYAMA *et al.*, 1984; JENSEN & YAKSH, 1984).

Os nociceptores podem ser funcionalmente divididos em grupos distintos – térmicos, mecânicos, polimodais e “silenciosos”. Os nociceptores térmicos, bem como a maioria dos nociceptores mecânicos, correspondem à fibras mielinizadas de pequeno diâmetro do tipo A δ , com uma velocidade de condução situada entre 5 e 30 m/s. Os terminais dos axônios nociceptivos mecânicos e térmicos não possuem bainha de mielina, e por esta razão, são descritas como terminações nervosas livres. Devido à inexistência de uma barreira física protetora, tais estruturas são sensíveis a agentes químicos liberados pelos tecidos no sítio da lesão; essas substâncias difundem-se por uma distância de diversos milímetros, podendo iniciar ou modular a atividade de outros nociceptores circunjacentes. A maioria dos receptores polimodais – que respondem a vários estímulos nociceptivos – são encontrados em diferentes espécies, e compostos por fibras amielínicas do tipo C, cuja velocidade de condução é bem mais lenta, geralmente menos que 1 m/s. Os campos receptivos mecânicos ou térmicos dos receptores polimodais justapõem-se extensivamente. Tal como os nociceptores anteriormente descritos, os receptores polimodais não possuem uma cápsula celular que sirva de barreira para os mediadores químicos da dor (DUBNER & BENNETT, 1983; MILLAN, 1998; STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000).

A condução “rápida” pelas fibras A δ e a “lenta” pelas fibras e C são responsáveis por dois tipos diferentes de dor. Os sinais rapidamente transmitidos, muitas vezes com alta resolução espacial, é denominado “primeira dor” ou “em pontada” é bem localizada e mais facilmente tolerada, sendo freqüentemente acompanhada por um “reflexo de retirada”; os sinais transmitidos lentamente estão associados a um forte componente afetivo e à localização menos precisa, são descritos como “segunda dor” ou “em queimação”, sendo pobremente tolerada (STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000). A codificação de estímulos nocivos em uma mensagem nociceptiva resulta de uma série complexa e interativa de mecanismos integrados em todos os níveis do neuro-eixo, desde a periferia, via corno dorsal da medula (“processamento primário”), até estruturas nervosas hierarquicamente superiores como o tálamo (“processamento secundário”), ou ainda, centros córtico-límbicos. A dor é iniciada pela ativação de nociceptores específicos (“dor nociceptiva”), por dano de fibras sensoriais, ou por lesão no próprio SNC (“dor neuropática”). Enquanto a dor nociceptiva aguda ou subcrônica desempenha um papel de alerta, a dor neuropática representa uma síndrome mal-adaptativa (JENSEN & YAKSH, 1984; MILLAN, 1998; STEWART *et al.*, 1999; BASBAUM & JESSEL, 2000).

A dor pode resultar diretamente da ação sobre os nociceptores aferentes primários, ou indiretamente pela liberação de substâncias químicas no exsudato, incluindo “cininas” (bradicinina – BK; substância P – SP), histamina, serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh), ATP, íons K⁺ e H⁺, CGRP (proteína relacionada com o gene da calcitonina), prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (KAR *et al.*, 1989; MORTON & HUTCHISON, 1989; MILLAN, 1998). Quando ocorre uma lesão tecidual consecutiva a estímulos mecânicos, térmicos ou antígeno-anticorpo (Ag – Ac), há uma resposta

inflamatória que se continua até que os processos de reparação e regeneração se completem. Os sinais cardinais deste fenômeno foram descritos por Celsius no primeiro século d. C., consistindo em calor, rubor, dor e edema; no século seguinte, Galeno adicionou um quinto elemento – a alteração funcional (FRANKLIN & ABBOTT, 1989). A perda da função parece estar particularmente associada à dor resultante da irritação persistente dos nociceptores, que leva à inibição pós-sináptica reflexa do movimento muscular de defesa (FRANKSTEIN, 1981; MILLAN, 1998).

As PGs, isoladamente, não excitam as fibras responsáveis pela nocicepção. Contudo, parecem sensibilizar os aferentes primários a substâncias algésicas (MILLAN, 1998). A substância P (SP) é um undecapeptídeo encontrado em neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro (MENETREY & BASBAUM, 1987; MORTON & HUTCHINSON, 1989). Impulsos antidrômicos nos nociceptores aferentes primários levam ao aumento da SP nos terminais nervosos que, associado a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, produz a liberação de NO, opióides endógenos, citocinas (“CKs”) e migração leucocitária, com predomínio de monócitos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos. Por sua vez, ocorre um aumento na liberação de BK, na produção de histamina pelos mastócitos e de 5-HT pelas plaquetas no líquido extracelular circunjacente; ambas são capazes de ativar potentemente os nociceptores. Estes, outra vez ativados, levam à síntese e liberação “de novo” de tais substâncias, criando um ciclo auto-sustentado de estímulos nociceptivos de origem inflamatória, causando hiperalgesia secundária. Hiperlgesia significa, literalmente, dor exagerada e inclui tanto dor anormalmente forte em consequência de um estímulo nocivo, quanto respostas dolorosas à estímulos tácteis ou térmicos não-nocivos. Muitas vezes, a hiperlgesia pode ser acompanhada pela hipoestesia, sendo considerada usualmente como um sinal de

desnervação de uma via aferente. Ao nível molecular, há desnaturação de proteínas determinada pela ação de enzimas proteolíticas (proteases, esterases e collagenases), liberadas a partir da ruptura das membranas lisossomais consecutiva à ativação fagocitária, bem como sinais de regeneração e reconstrução da matriz conjuntiva (LINDBLOM & VERRILLO, 1979; JENSEN & YAKSH, 1984; RANG *et al.*, 1997; SATYABRATA *et al.*, 1989; ACHAVAL, 1991; WANNAMACHER & FERREIRA, 1998; MILLAN, 1998; LIKAR *et al.*, 1998; MONTENEGRO & FRANCO, 1999).

2.2 NÍVEIS E MECANISMOS MODULATÓRIOS

Sob o ponto de vista evolutivo, tão importante quanto perceber um estímulo danoso ou potencialmente danoso, é a modulação inibitória da percepção desses estímulos, traduzidos, muitas vezes, na forma de dor. Esta origina um “status” neuroquímico e fisiológico que, se forem muito intensos ou prolongados, podem interferir nas respostas comportamentais complexas adequadas às situações nas quais a dor foi produzida, diminuindo as chances de sobrevivência do indivíduo (MILLAN, 1998; WIERTELAK *et al.*, 1994c; TRAUB, 1997).

A dor pode ser eficientemente diminuída por vários mecanismos endógenos no SNC (STEIN, 1995; MILLAN, 1998). Estudos visando estabelecer a correlação entre o comportamento do animal e os circuitos neurais centrais específicos tem demonstrado a existência de vias descendentes supressoras de dor, localizadas em diferentes níveis do SNC. A estimulação elétrica, a administração de opióides ou de 5-HT ativam essas vias descendentes e produzem um comportamento ao qual se atribui analgesia quando mensurados por testes aversivos como “hot-plate” e “tail-

flick”, ou em modelos de dor crônica (LEVINE *et al.*, 1980; ABBOTT & MELZACK, 1982; DUBNER & BENETT, 1983; KATAYAMA *et al.*, 1984; JENSEN & YAKSH, 1984; TAIWO *et al.*, 1985; BARDIN *et al.*, 2000).

Uma região onde estes mecanismos têm sido bem caracterizados é o corno dorsal da medula espinhal, no qual impulsos dos nervos periféricos são modulados antes que estes sejam transmitidos a níveis mais centrais para evocar percepção e resposta (BROWN, 1983; DUBNER & BENNETT, 1983; TAIWO *et al.*, 1985; MENETREY & BASBAUM, 1987; KAR *et al.*, 1989). Alguns estudos têm evidenciado que, em adição àqueles mecanismos pertinentes ao SNC, a modulação intrínseca da nocicepção pode ocorrer nas terminações periféricas dos nervos aferentes (STEIN, 1995; COGGESHALL *et al.*, 1997; LIKAR *et al.*, 1998). Além disso, tais estudos indicam que o sistema imune pode atuar sobre as terminações sensitivas dos nervos periféricos contribuindo para a inibição da dor. Esta ligação neuro-imune foi descoberta durante uma pesquisa que examinava os mecanismos de analgesia por opióides nos tecidos periféricos. Em contraposição à visão tradicional que a anti-nocicepção provocada por estas substâncias ocorre exclusivamente no SNC, existem receptores opióides periféricos que mediam efeitos analgésicos quando ativados por agonistas opióides exógenos aplicados localmente (MILLAN, 1998).

3 SISTEMA OPIÓIDE

Dentre os alcalóides isoquinolínicos, pode-se destacar um grupo de particular interesse em farmacologia: os alcalóides bensilisoquinolínicos, também denominados “alcalóides do ópio”. Apesar do ópio e seus efeitos serem conhecidos desde a Mesopotâmia, conforme registros arqueológicos deixados pelos antigos

sumérios, foi somente nos escritos de Theophrastus (III séc. a.C.) onde se encontrou a primeira referência histórica idônea quanto ao uso desta substância. A palavra *opium* significa “suco” em grego, sendo a droga obtida do suco da papoula (*Papaver somniferum*), planta que contém cerca de 25 alcalóides, dos quais a papaverina, morfina e codeína permanecem em uso clínico. Os dois últimos podem ser considerados como derivados fenantrênicos sob o ponto de vista estrutural, embora biossinteticamente derivem da tirosina, via alcalóides benzilisoquinolínicos (SCHENKEL *et al.*, 1999; GUSTEIN & AKIL, 2001).

O uso do ópio era corriqueiro na medicina árabe, sendo levado para o Ocidente em caravanas juntamente com as especiarias que vinham do Oriente. Entretanto, coube a Paracelsus (1493 – 1541) o mérito de repopularizar o uso do ópio na Europa, após ter sido abandonado por causa de sua toxicidade. Muitas das aplicações do ópio, tais como para o controle de disenterias, eram conhecidos por volta dos meados do séc. XVI, e Sydenham (1680) descreveu que “...entre os remédios que o Deus Todo-Poderoso reservou ao homem para aliviar seus sofrimentos, nenhum é tão universal e eficaz quanto o ópio...”. O pó do ópio tem usos bem diferentes dos apresentados para a tintura de ópio (anti-espasmódico para a musculatura lisa), e mais ainda dos alcalóides isolados, tais como a morfina (analgésico de ação no SNC) e a codeína (anti-tussígeno). Este aspecto evidencia que, raramente a uma planta medicinal, podem ser imputadas indicações terapêuticas. O efeito farmacológico está ligado diretamente ao modo de emprego, onde a planta medicinal deve ser vista como a matéria-prima do medicamento (SCHENKEL *et al.*, 1999; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

Tanto os derivados naturais do ópio como substâncias sintéticas, capazes de ligação a vários receptores específicos, são denominados opióides. Os derivados

opióides são alguns dos analgésicos mais eficazes usados em humanos, indicados no tratamento das dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondem a analgésicos menos potentes ou que, por sua natureza, não são a eles suscetíveis. Também são eficazes no controle da dor crônica, sendo a tolerância e a dependência física fatores limitantes do uso prolongado (LEVINE *et al.*, 1980; MARTIN, 1984; MARTINDALE, 1999; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

O problema de abuso e de adição aos opióides levou à pesquisa em busca de analgésicos mais potentes que não tivessem este efeito colateral indesejável. Por volta de 1940, foram introduzidos na prática clínica compostos sintéticos como a meperidina e a metadona, mas estes demonstraram possuir os efeitos típicos observados com a morfina. A nalorfina, um derivado da morfina, constituía uma exceção, pois antagonizava os efeitos da morfina, sendo usada no início da década de 50 para reverter a intoxicação com esta droga. Doses maiores de nalorfina mostraram-se analgésicas nos pacientes em pós-operatório, mas a droga não é utilizada na prática com esta finalidade, por causa dos seus efeitos colaterais, incluindo ansiedade e sudorese. Entretanto, devido ao seu perfil farmacológico, a nalorfina levou ao desenvolvimento de novas drogas, como o antagonista naloxone e os compostos com ações mistas, por exemplo, pentazocina, butorfanol e buprenorfina. Milhares destes fármacos, com estruturas diversas, têm sido sintetizados e investigados quanto às suas propriedades analgésica, anti-diarreica, antitussígena e de provocar dependência. Estes fármacos, além de aumentarem o arsenal terapêutico disponível, propiciaram os meios necessários para a exploração dos mecanismos de ação dos opióides (DUGGAN & NORTH, 1984; MARTIN, 1984; RANG *et al.*, 1997; WANNAMACHER & FERREIRA, 1998; MARTINDALE, 1999; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

Avanços têm sido obtidos nos estudos pertinentes à natureza da transdução de sinal, particularmente no que se refere às intrincadas ligações moleculares que regulam a condutância iônica. As moléculas responsáveis pelo reconhecimento de ligandos formam complexos funcionais de moléculas transdutoras, amplificadoras e efetoras que permitem à célula responder adequadamente a uma série de ligandos extracelulares. Em cada sistema de ligandos transmissores estudado em detalhes, tem sido encontrado mais de um tipo de receptor conforme critérios fisiológicos e farmacológicos (BLOMM, 1988; SCHULMAN & HYMAN, 1999). A pesquisa com analgésicos opióides tem fornecido elementos importantes para a formulação de teorias a cerca de seus receptores, bem como para o entendimento das bases celulares e moleculares da analgesia induzida por opióides, a caracterização do sítio de ligação ao receptor e dos mecanismos de acoplamento que são responsáveis pelo início da ação farmacológica, bem como a interação entre estes componentes do receptor são questões fundamentais ainda não plenamente respondidas em farmacologia (LEVINE *et al.*, 1980; MARTIN, 1984; DUGGAN & NORTH, 1984; FERREIRA & WANNAMACHER, 1998).

A abordagem para a identificação de receptores tem envolvido, basicamente, dois processos: a determinação de um perfil exclusivo com agonistas opióides e de antagonistas com vários graus de seletividade, e o estudo da cinética de ligação saturável e estereo-específica para várias frações de tecidos (DUGGAN & NORTH, 1984; MESTEK *et al.*, 1995; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

Os efeitos eletrofisiológicos dos opióides sobre o sistema nervoso têm sido analisados em seus diversos níveis, utilizando uma variedade de preparações técnicas *in vivo* e *in vitro* de registro e métodos de aplicações de drogas (sistêmica, microeletroforética ou intoforética, micropipetas e pressão de ejeção, perfusão de

tecidos *in vitro*, microinjeção de opiáceos). As duas abordagens principais empregadas para essa finalidade são (DUGGAN & NORTH, 1984):

1º) análise quantitativa de mudanças nas características de um único neurônio ou de grupos de neurônios durante a aplicação de opióides diretamente sobre eles. Isso inclui estudos das propriedades passivas de membrana, excitabilidade elétrica (geração e propagação do potencial de ação), excitabilidade química (propagação de potencial sináptico) e propriedades neurosecretórias;

2ª) análise de como as alterações induzidas por opióides na função de certos neurônios afetam outras áreas do SN, como por exemplo, o registro da atividade neuronal nos diferentes níveis do neuro-eixo em resposta a um estímulo cutâneo nocivo, e o estudo dos efeitos dos opióides aplicados em diferentes níveis.

Os diversos analgésicos pertencentes a este grupo têm sido classificados como opiáceos ou drogas semelhantes à morfina, ou então como analgésicos opióides, conforme as diferenças farmacológicas encontradas em relação à morfina. Os opióides diferem dos opiáceos de duas formas: a) eles podem exibir atividade antagonista em relação aos opiáceos, atuando como “antagonistas competitivos” ou “agonistas parciais”; ou b) podem ter efeitos distintos daqueles apresentados pelos analgésicos opiáceos. O grupo dos analgésicos opióides abrange agonistas puros, agonistas parciais (agonistas / antagonistas mistos) e antagonistas, bem como peptídeos endógenos com atividade opióide ainda não explorados como agentes terapêuticos, que ligam-se a receptores endógenos específicos ($\mu 1$ e $\mu 2$, κ , δ , ρ , e ϵ), localizados no SNC e órgãos periféricos (MARTIN, 1984; DUGGAN & NORTH, 1984; RANG *et al.* 1997; FERREIRA & WANNAMACHER, 1998; MARTINDALE, 1998; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

O naloxone é um congênere da oximorfona, diferindo estruturalmente desta pela substituição do grupo metil ligado ao átomo de nitrogênio por um grupo alil. É definido como um antagonista opióide essencialmente puro, isto é, não possui as propriedades agonísticas ou características morfínomiméticas de outros antagonistas aos narcóticos. Em clínica médica, é indicado para prevenir alguns efeitos dos opiáceos incluindo depressão respiratória, sedação e hipotensão. Também pode reverter os efeitos disfóricos ou psicomiméticos de agentes agonista-antagonistas, como a pentazocina (MARTINDALE, 1999; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

O entendimento do mecanismo de ação dos opióides nos nervos periféricos têm surgido de estudos em animais da “analgesia” produzida por estas substâncias nos tecidos periféricos, a maioria dos quais ocorrendo durante inflamação. Nos vertebrados, a identificação de receptores opióides nas terminações periféricas de neurônios aferentes primários, bem como a expressão dos seus mRNAs no gânglio da raiz dorsal, servem de embasamento teórico para explicar os efeitos analgésicos obtidos com opióides localmente aplicados (STEIN, 1995; COGGESHALL *et al.*, 1997; LIKAR *et al.*, 1998).

Para explorar as bases moleculares dos mecanismos que contribuem para a tolerância aos opióides, Mestek e cols. (1995) isolaram um cDNA para o receptor opióide μ , alvo de narcóticos tais como a morfina, codeína, metadona e fentanil. O receptor codificado por este cDNA possui uma seqüência de 400 amino-ácidos, com 94% de similaridade com o mesmo receptor em ratos. A transcrição do cDNA no COS-7 celular produz sítios de ligação com alta afinidade para receptores agonistas e antagonistas seletivos μ . Este receptor apresenta características como aquelas dos canais de K^+ ativados por proteínas G. Quando ambas as proteínas foram expressas nos ovócitos de *Xenopus*, desenvolve-se dessensibilização funcional

após estimulação repetida do receptor μ , observada pela redução na corrente de K^+ consecutiva à ativação de um segundo receptor μ induzida pela ativação do primeiro receptor. A extensão da dessensibilização foi potencializada pela proteína-quinase Ca^{++} /calmodulina – dependente da proteína-quinase C (PKC). Estes resultados indicam que a modulação pela proteína-quinase é um mecanismo molecular pelo qual a dessensibilização da sinalização do receptor μ pode ser regulado a nível celular, sugerindo que este mecanismo pode contribuir para o desenvolvimento da tolerância a opióides em seres humanos. Segundo Montenegro e Franco (1999), a adaptação ou a tolerância à morfina se faz não por alterações dos receptores ou dos transdutores (proteínas G), mas pelo fato de que os neurônios mantidos por longo tempo com níveis baixos de AMPc aumentam a expressão dos genes para as PKAs e para a adenil-ciclase, compensando parcialmente, dessa maneira, a deficiência de AMPc. Quando o uso da morfina é suprimido, os neurônios estão com níveis muito elevados daquelas enzimas e tornam-se extremamente excitáveis, causando as manifestações observadas na síndrome de abstinência.

Os peptídeos opióides, ou endorfinas, constituem uma importante e abundante família de neuropeptídeos. O termo “endorfina” é um nome genérico empregado para identificar compostos semelhantes à morfina “endógena”, ou em outros termos, todas aquelas substâncias naturais ou sintéticas que têm propriedades similares às da morfina (GUTSTEIN & AKIL, 2001).

A síntese dos neuropeptídeos é similar a de outras proteínas, envolvendo translação de seqüências de mRNA nos ribossomas. A translação usualmente produz uma pré-proteína relativamente grande ou precursor do neuropeptídeo. A clivagem proteolítica inicial do precursor protéico ocorre no retículo endoplasmático e no aparelho de Golgi. O estágio final do processo pós-translacional ocorre após o

precursor e as enzimas proteolíticas serem empacotadas no interior de grânulos neurosecretórios, que são transportados até os terminais neuronais para estoque ou liberação. As moléculas precursoras em alguns peptídeos sintetizados por neurônios contém diversas seqüências de amino-ácidos do mesmo neuropeptídeo. Isso permite aos neurônios produzirem múltiplas cópias de um determinado neuropeptídeo, e desta forma multiplicar o sinal produzido pela translação das moléculas precursoras. As moléculas precursoras dos peptídeos sintetizados por neurônios também pode conter seqüências de amino-ácidos de diversos neuropeptídeos diferentes. Mudanças no padrão de clivagem no precursor pode produzir diferentes grupos de neuropeptídeos, cada um dos quais pode ter efeito bem diferente (PEDERSEN *et al.*, 1998; GUTSTEIN & AKIL, 2001).

Os opióides endógenos têm recebido mais atenção do que qualquer outra família de neuropeptídeos. Aproximadamente 18 moléculas opióides separadas, foram descritas até o momento, entre as quais a β -endorfina, Leu-Enk, Met-Enk e DYN, todos originários de três moléculas precursoras principais, a POMC, a pré-pró-ENK e a pré-pró-DYN, sendo cada uma sintetizada em uma população de neurônios diferentes (McGINTY & BLOOM, 1983; KAR *et al.*, STEIN, 1995; 1989; PEDERSEN *et al.*, 1998).

4 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

A 5-HT foi originalmente descoberta em 1948, ano em que estava sendo pesquisada a identidade de uma substância vasoconstritora liberada quando se deixava o sangue coagular. Inicialmente foi denominada *serotonina*, um nome ainda amplamente utilizado para denotar sua origem e sua ação biológica.

Subseqüentemente, foi detectada na via gastrintestinal e no SNC e demonstrou-se que a 5-HT tinha um importante papel como NT, atuando também como hormônio local no sistema vascular periférico (SANDERS-BUSH & MAYER, 2001).

Assim como outras aminas biogênicas, a 5-HT tem funções biológicas específicas como NT, Nmod ou NH, sendo encontradas especialmente no SN. Observam-se, também, muitas combinações e concentrações diferentes de caráter espécie-específico. A formação de aminas a partir de amino-ácidos requer uma etapa que passa por um processo de descarboxilação, mas em termos de bioquímica comparada, pouco se sabe à respeito das enzimas correspondentes. Parte dos NTs liberados no espaço extracelular em vertebrados é reabsorvida pelas terminações nervosas. O excesso de aminas no cérebro de vertebrados é oxidado pela mono-amino-oxidase mitocondrial (MAO), formando aldeídos. As aminas biogênicas também podem ser oxidadas por outras enzimas. As MAOs são flavina-adenina-dinucleotídeos (FADs) que se localizam na membrana mitocondrial externa e produzem peróxido de hidrogênio. Elas são particularmente ativas no fígado, rim e parede intestinal, aonde são capazes de desintoxicação, e no cérebro, aonde estão envolvidas na regulação da concentração de NTs. Existem dois tipos de MAOs em mamíferos, aves, répteis e anuros adultos: o tipo A oxida a 5-HT e é inibida pela clorgilina, enquanto o tipo B atua sobre a benzilamina e é insensível ao inibidor. Em grande parte, os dois tipos são encontrados juntos em proporções que dependem do tipo de tecido; porém, o baço e testículo de ratos contém somente o tipo A, e o fígado murino, cérebro porcino e plaquetas humanas possuem o tipo B, sendo esta uma provável forma evolutivamente derivada. O tipo B é ausente em teleósteos, perfaz menos que 10% da atividade total das MAO em urodelos, aparece em anuros

somente antes da metamorfose, e surge mais tarde que o tipo A nos fetos de mamíferos (POWELL *et al.*, 1989; URICH, 1994).

A biossíntese da 5-HT segue uma via semelhante à da Nor, à exceção de que o aminoácido precursor é o triptofano e não a tirosina. O triptofano é convertido em 5-HT (nas células cromafins e nos neurônios, porém não nas plaquetas) pela ação da triptofano-hidroxilase, uma enzima exclusiva de células produtoras de 5-HT. O 5-hidroxitriptofano é, em seguida, descarboxilado em 5-HT por uma descarboxilase inespecífica, que atua sobre muitos outros substratos e que também está envolvida na síntese de catecolaminas e de histamina. As plaquetas e os neurônios possuem um mecanismo de captação com elevada afinidade pela 5-HT (PEDERSEN *et al.*, 1998; RANG *et al.*, 1997; SANDERS-BUSH & MAYER, 2001).

Em seres humanos, as maiores concentrações de 5-HT no organismo encontram-se (RANG & DALE, 1998; KAPLAN & SADOCK, 1998; PEDERSEN *et al.*, 1998; THADDEU, 1998; VEENSTRA-VANDERWEELE *et al.*, 2000; SANDERS-BUSH & MAYER, 2001):

- a. Na parede do intestino – grande parte da 5-HT corporal encontra-se em células originárias da crista neural, as células enterocromafins, localizadas principalmente na mucosa do estômago e do intestino delgado. Certa quantidade de 5-HT também é encontrada nas células nervosas do plexo mioentérico, atuando como um provável NT excitatório;
- b. No sangue – a 5-HT está presente em concentrações elevadas nas plaquetas, captada à partir da circulação intestinal. A 5-HT gera agregação plaquetária, e as plaquetas que ficam retidas no vaso liberam mais 5-HT. Em presença de um endotélio íntegro, a liberação de 5-HT das plaquetas aderidas causa vasodilatação, ajudando assim a manter o fluxo sangüíneo;

c. No SNC – atua com NT. A 5-HT desempenha importantes papéis fisiológicos na modulação do humor, impulso, apetite, temperatura corporal, secreção neuro-endócrina, sono e nocicepção, encontrando-se na gênese de uma série de perturbações psiquiátricas, incluindo, agressividade, suicídio violento, ansiedade e depressão, transtornos obsessivo-compulsivo e do apetite, psicose, dentre outras. As principais vias serotoninérgicas partem dos núcleos da rafe bulbares (*pallidus* e *obscurus*) e bulbo-pontino (núcleo magno da rafe). Entre a parte superior da ponte e o tegmento mesencefálico encontra-se o núcleo mediano, que, ao lado do núcleo dorsal da rafe, de localização mesencefálica, desempenha um importante papel no comportamento. Os núcleos mais caudais inervam o tronco encefálico e o cerebelo, projetando vias descendentes para a medula espinhal. Os núcleos intermediários projetam os seus axônios para o sistema límbico, enquanto as fibras originárias do núcleo da rafe direcionam-se para o neocórtex e o neostriado.

Além da sua ação localizada sobre os nociceptores, a 5-HT é um NT que desempenha um papel inibitório na transmissão nociceptiva ao nível das vias descendentes medulares e bulbo-espinhais (SASAKI *et al.*, 2001). Estudos realizados por Taiwo e cols. (1985) verificaram a potencialização dos efeitos antinociceptivos da combinação entre morfina e os inibidores da recaptação de monoaminas na medula espinhal de gatos em testes tipo “tail-flick”. Sasaki e cols. (2001) sugeriram que os receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ estão envolvidos na antinocicepção mediada pela medula espinhal em ratos submetidos a testes aversivos químicos com formalina. Estudos clínicos têm demonstrado a eficácia analgésica dos antidepressivos tricíclicos no tratamento de várias síndromes dolorosas. Embora seu mecanismo de ação pouco seja conhecido, o efeito

analgésico não possui relação com a dose administrada ou com a modulação do humor (WANNAMACHER & FERREIRA, 1998).

Por outro lado, algumas evidências contrariam o papel inibitório da 5-HT na medula espinhal em resposta a estímulos nociceptivos (SOJA & SINCLAIR, 1980), ou da sua administração intratecal em modelos de dor difusa (BARDIN *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos com experimentos imuno-histoquímicos e bioquímicos para a determinação de 5-HT em modelos com transecção de medula espinhal, sugerem que a 5-HT medular não é originária do encéfalo (HADJICONSTATINOU *et al.*, 1984). Esse fato, associado aos inúmeros tipos e subtipos de receptores serotoninérgicos conhecidos até o presente (PAWELS, 2000; VEESTRA-VANDERWEELE *et al.*, 2001), podem, até certo ponto, explicar as diferenças encontradas. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação subjacentes à modulação nociceptiva.

5 SISTEMAS OPIÓIDE E SEROTONONÉRGICO EM INVERTEBRADOS

5.1 SISTEMA OPIÓIDE

O interesse pelo papel que os neuropeptídeos desempenham na modulação comportamental, levou à identificação de peptídeos opióides e de seus receptores bioquímicos, em diversas espécies de invertebrados; os resultados obtidos através de investigações comportamentais, eletrofisiológicas, imunológicas e farmacológicas, são semelhantes aos dos vertebrados, e estão envolvidos na mediação de respostas comportamentais à estímulos aversivos térmicos em várias

espécies de gastrópodos (LEUNG & STEFANO, 1987; KAVALIERS, 1983, 1987, 1991; KAVALIERS & OSSENKOPP, 1993; GUTIÉRREZ, 1991).

Em alguns trabalhos pioneiros para estudar os efeitos dos opióides nos invertebrados, Stefano e Catapane (1979) e Stefano e cols. (1980), demonstraram que a aplicação exógena de opióides poderia regular os níveis de dopamina no SNC em *Mytilus*. Além disso, têm demonstrado uma interrelação entre os sistemas encefalinérgico e dopaminérgico em ambos, no SN de vertebrados e de invertebrados, cujo controle nas variações dos níveis de dopamina nos terminais pré-sinápticos dopaminérgicos, faz-se através de sítios de ligação com alta afinidade para opióides (STEFANO *et al.*, 1982; KAVALIERS, 1983).

Alguns peptídeos atuam como NTs durante a excitação das sinapses. Isto tem sido demonstrado para a SP, beta-endorfina, encefalina e somatostatina, e provavelmente aplica-se também à VIP, PP, angiotensina, ACTH e CCK. Aproximadamente metade das sinapses no cérebro humano funcionam com NTs “clássicos”, tais como ACh, aminas biogênicas (dopamina, Nor, 5-HT), e amino-ácidos (GABA, GLY, GLU, ASP), sendo a outra metade possivelmente de natureza peptidérgica. A função neuromodulatória diz respeito a atividade endócrina dos peptídeos, contrastando com a ação neurotransmissora (URICH, 1994). Também no caso dos peptídeos com ação hormonal, tem sido demonstrada a presença de seqüências similares que indiquem um ancestral comum. Algumas dificuldades estão relacionadas com seqüências nas quais uma evolução convergente não pode ser excluída. O sistema opióide nos invertebrados parece ser tão complexo e análogo ao seu correspondente em mamíferos. As diversas respostas à estressores indicam que o cérebro de mamíferos possui sistemas neuroquímicos opióides e não-opióides envolvidos na resposta à estímulos ambientais aversivos e nocicepção,

havendo substanciais evidências da participação dos opióides na modulação de comportamentos básicos e processos fisiológicos em invertebrados. No sistema nervoso de invertebrados, a glia é o principal componente tecidual, tal como nos vertebrados. A presença de hormônios, peptídeos e receptores opióides endógenos, têm sido demonstrada nos processos imunes que ocorrem tanto na micróglia do cérebro de vertebrados, como em invertebrados. Por exemplo, peptídeos com atividade imunológica e biológica correspondendo à insulina dos vertebrados, também foram detectados em tunicados, insetos, crustáceos, gastrópodos, cefalópodos, ciliados, e em muitos fungos e procaríotos. Inúmeras evidências indicam que representantes destes grupos de invertebrados possuem somatostatina, hormônio adreno-córtico-trófico (ACTH), peptídeos da família POMC, hormônio liberador de córticotrofina (CRH), β -endorfinas, hormônio melanócito-estimulante fração α (α -MSH), encefalinas (ENKs), gastrina, colecistoquinina (CCK), secretina, substância P (SP), peptídeo pancreático (PP), peptídeo vaso-intestinal (VIP), hormônio anti-diurético ou vasopressina (ADH), calcitonina, peptídeo de molusco relacionado com a insulina (MIP-III) dentre outros (SCHOT *et al.*, 1981; ORTÍZ *et al.*, 1987; KORBIESKI *et al.*, 1988; STEFANO *et al.*, 1988; CURRY *et al.*, 1992; LI & GERAERTS, 1992; HERNÁDI & ELEKES, 1993; URICH, 1994; SONETTI *et al.*, 1997; SALZET & STEFANO, 1997; LEUNG & STEFANO, 1987; KAVALIERS, 1987, 1989; RENZELLI-CAIN & KALOUSTIAN, 1995; CLATWORTHY, 1996; MAINS & EIPPER, 1998; ZANCAN *et al.*, 1997).

Comparado com os vertebrados, os invertebrados possuem poucos órgãos endócrinos. Por outro lado, as células com função neuro-secretora são numerosas, indicando que muitos processos fisiológicos nestes animais são regulados através

de neuro-hormônios (NHs) (PLESCH, 1977; SCHOT *et al.*, 1981; KORBIESKI *et al.*, 1988).

5.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Nas últimas quatro décadas, estudos realizados em vertebrados e invertebrados permitiu que se criasse um consenso entre os pesquisadores de que a 5-HT é amplamente distribuída tanto em vertebrados quanto em invertebrados, mediando inúmeras funções fisiológicas graças à multiplicidade de receptores (WALCOURT-AMBAKEDEREMO & WINLOW, 1994; TIERNEY, 2001). Esta homologia pode ser estendida aos sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de aminas biogênicas, especialmente a 5-HT. Por exemplo, o rim porcino contém uma descarboxilase inespecífica que pode converter a histidina, fenilalanina, tirosina, triptofano e 5-hidróxi-triptofano; uma enzima com propriedades muito semelhantes também é encontrada no cérebro de insetos (URICH, 1994).

Especula-se que uma das razões para a ampla distribuição da 5-HT e de seus receptores entre os seres vivos, deva-se à antiguidade do sistema serotoninérgico como sinalizador celular, existente mesmo antes que fatores evolutivos provocassem a separação entre vertebrados e invertebrados, ocorrida há cerca de 600 milhões de anos (TIERNEY, 2001).

Estudos realizados em modelos invertebrados mostram que a 5-HT está envolvida na modulação de mecanismos homeostáticos básicos como alimentar (KUPFERMAN *et al.*, 1991; MURPHY, 1991), reprodutivo e sensorial (BAXTER & BYRNE, 1989; MOROZ *et al.*, 1997), atividade cardíaca (JAEGER & FARIAS, 1977), postura e locomoção (MACKEY & CAREW, 1983; SATTERLIE, 1991),

aprendizado e plasticidade sináptica (KATZ & FROST, 1995; EMPTAGE *et al.*, 1996) e sensibilização (SHEVELKIN *et al.*, 1998).

Em *Helix aspersa* procedimentos imuno-histoquímicos e com radio-imunoensaio revelaram que neurônios contendo 5-HT, situados em cada gânglio metacerebral também contém CCK e SP, sendo que a fração carboxi-terminal da CCK em invertebrados assemelha-se com a CCK e gastrina de mamíferos (OSBORNE *et al.*, 1982). Neste modelo, as reações imuno-histoquímicas positivas em varicosidades na região do corpo celular e na bainha neural do gânglio central, fornecem evidências de uma ação regulatória não-sináptica de neurônios serotoninérgicos localizados no SNC, modulando as atividades neuronal do pericário, neuro-muscular e neuro-hormonal periféricos (ELEKES, 1991). Em um estudo anterior, Boyd e cols. (1985) empregaram os antagonistas de receptores 5-HT, metisergida e ketanserina, em corações dissecados de *Helix*, e observaram diferenças entre as respostas obtidas, sugerindo a existência de receptores distintos. Walcourt-Ambakederemo e Winlow (1994), aplicaram os mesmos fármacos em culturas de neurônios obtidos do SN e da massa bucal de *Lymnaea stagnalis*, e concluíram que os receptores 5-HT₂ neste modelo experimental são análogos aos encontrados em mamíferos.

Com os resultados obtidos em experimentos com histofluorescência pelo método do ácido glioxílico e tratamentos com 5,7-di-hidroxi-triptamina em *Megalobulimus oblongus*, Zancan e cols. (1997) realizaram o mapeamento dos neurônios monoaminérgicos no SNC, que permitiram estabelecer comparações com outros gastrópodes. Em um estudo anterior neste modelo, Jaeger e Farias (1977) analisaram os efeitos da metroxitriptamina e dos inibidores da mono-amino-oxidase (IMAO) no coração e no músculo retrator do pênis.

6 O ESTUDO DA NOCICEPÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS E A UTILIZAÇÃO DE MODELOS NÃO-MAMÍFEROS

O estudo da nocicepção, dor e analgesia é uma importante área da pesquisa biomédica, que têm permitido avanços expressivos para compreender o que significa dor aguda ou crônica, cujos resultados podem ser aplicados à terapêutica. Esta área de pesquisa examina a fisiologia da transmissão da dor, bem como a farmacologia das drogas analgésicas, utilizando uma ampla variedade de modelos *in vivo* ou *in vitro*. Contudo, há um número significativo de situações clínicas em que a percepção dolorosa torna-se refratária aos tratamentos estabelecidos, constituindo-se num verdadeiro desafio. Entre os fatores que limitam o manejo adequado nestes casos, encontram-se tolerância e efeitos colaterais das drogas empregadas (STEVENS, 1992).

A utilização de métodos e modelos indubitavelmente tem seu mérito na avaliação e interpretação de dados em farmacologia clínica, mas é um processo que obriga à observância de regras e conceitos científicos rigorosos. Quando se busca a “otimização” – palavra que se refere à qualidade de um determinado procedimento – o significado e a extensão dos termos “método” e “modelos” devem ser estabelecidos. O método é um procedimento planejado que leva à habilidade técnica na resolução de uma tarefa teórica ou prática; um modelo é a representação de um sistema por outro, usualmente mais familiar, cujo funcionamento é supostamente análogo ao menos familiar. Muito têm sido descrito à respeito da importância dos modelos experimentais, especialmente sobre modelos farmacodinâmicos e farmacocinéticos. A geração de novas hipóteses, que representam o progresso na

ciência, está intrinsecamente conectada à capacidade de moldar observações dentro de uma forma abstrata necessária para a construção ou adaptação de um modelo. Em suma, os modelos são valiosos principalmente para descrição (“modelos descritivos”), predição (“modelos preditivos”), e reconhecimento (“modelos explicativos”). Finalmente, a utilidade ou “validade pragmática” é essencial para a importância atribuída ao modelo (GERLOFF, 1997).

A investigação dos mecanismos neurais subjacentes à analgesia depende de testes que forneçam medidas objetivas em modelos animais (LEVINE *et al.*, 1980).

Modelos de inflamação ou patologia tecidual produzem um aumento persistente nos estímulos nociceptivos, associados a lesão tecidual periférica, podem levar a uma atividade neural alterada no SNC, aonde observam-se mudanças neuroquímicas (HUNSKAAR & HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989; BARDIN *et al.*, 2000; SASAKI *et al.*, 2001). Estas mudanças podem resultar na hiperexcitabilidade do sistema nociceptivo, persistência da dor, e aumento nas doses de analgésicos. Estes modelos podem fornecer novas informações que sejam aplicadas no desenvolvimento de novas abordagens para o controle da dor aguda ou crônica, em situações como período pós-operatório, neoplasias, artrite e neuropatia dolorosa (CASEY & DUBNER, 1989). Em tais casos, a dor resulta de múltiplas e complexas modificações em vias nociceptivas, incluindo alterações no fenótipo e estrutura neuronais, sinapse e expressão de proteínas tais como receptores, NTs e canais iônicos (ACHAVAL, 1991; WANNAMACHER & FERREIRA, 1998).

Numerosos estudos têm sido empreendidos para o desenvolvimento de novos protocolos laboratoriais visando determinar os efeitos de agentes analgésicos com narcóticos agonistas mistos. Mais de 50 testes diferentes para a dor utilizando

animais, a maioria roedores, predominantemente ratos e camundongos, além de outros incluindo primatas, têm sido descritos na literatura, e desenvolvidos para avaliação do potencial analgésico de drogas (FRANKLIN & ABBOTT, 1989).

Todavia, como ainda é muito difícil estudar as funções integrativas do SN de vertebrados e correlacionar a neurobiologia celular com o comportamento, os neurônios dos moluscos têm sido usados para estudos celulares, que são difíceis, ou mesmo impossíveis, de serem realizados em vertebrados. O grande tamanho dos neurônios, individualizados, e o fácil acesso para registros fisiológicos intracelulares são características importantes que possibilitam a realização de diversos trabalhos experimentais. Assim sendo, recentemente, uma atenção especial vem sendo prestada às interrelações que podem ser estabelecidas entre neurônios centrais e comportamento em modelos mais simples como gastrópodes (HEYER *et al.*, 1973; KAVALIERS, 1984; 1992; SAKHAROV *et al.*, 1993; DYAKONOVA *et al.*, 1995; KOJIMA *et al.*, 1998; ROMERO *et al.*, 1994; OSBORNE *et al.*, 1982; DULIN *et al.*, 1995; SCOTT *et al.*, 1997).

Inúmeros trabalhos para a caracterização morfológica de moluscos gastrópodes foram realizados, descrevendo elementos do SNC e SNP, junção neuro-muscular e musculatura pediosa. Apesar de uma ampla variedade adaptativa, um plano morfológico básico do SN destes animais permaneceu estável, possibilitando estabelecer diversas homologias entre os gânglios, e a identificação de células com características comuns nas diferentes espécies; a relativa constância durante o desenvolvimento, o número e a posição de grandes neurônios implica que a maioria deles são geneticamente especificadas. Na medida que identificamos tais células, podemos acompanhar as modificações ocorridas nos circuitos neurais e na junção neuro-muscular, em consequência de fatores evolutivos

e comportamentais. Por outro lado, esta abordagem anatômica comparada pode servir como respaldo para uma abordagem neuroquímico-anatômica comparada (NISBET, 1960; AMOROSO *et al.*, 1963; KERKUT *et al.*, 1966; ROGERS, 1969; NAGI & SAKHAROV, 1970; BENJAMIN & INGS, 1972; HEYER *et al.*, 1973; PERETZ & ESTES, 1974; PLESCH, 1977; MOFFETT, 1989; ESSAWY, 1994; MAGOSKI *et al.*, 1994; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999).

A simplicidade do SNC destes animais têm permitido a caracterização morfológica, bioquímica e eletrofisiológica de muitos neurônios centrais que formam os circuitos neurais envolvidos em diferentes comportamentos. Em moluscos, contudo, algumas respostas comportamentais, assim como muitos reflexos, são mediadas não somente pelo SNC, mas envolvem, também, elementos do SNP, sendo importante distinguir qual a influência exercida por estes dois componentes (BENJAMIN & INGS, 1972; BAILEY *et al.*, 1979).

Inúmeras evidências têm demonstrado que moluscos podem ser modelos experimentais particularmente importantes na avaliação dos efeitos comportamentais de peptídeos biologicamente ativos encontrados em vertebrados, bem como de seus análogos sintéticos (KAVALIERS, 1983).

A resposta eletrofisiológica à agonistas e antagonistas opióides fazem dos moluscos modelos particularmente interessantes de estudos de dependência opióides e da farmacologia do naloxone (GUTIÉRREZ, 1991).

As evidências citadas na literatura à respeito da existência de mecanismos modulatórios básicos filogeneticamente conservados em gastrópodes, destacam o envolvimento de esteróides neuro-ativos, peptídeos opióides e da 5-HT em nocicepção, LTP e sensibilização de nociceptores, facilitação e inibição de reflexos de retirada (WRIGHT & CAREW, 1995; DYAKONOVA *et al.*, 1995; KATZ &

FROST, 1995; KAVALIERS et al., 1997; SHEVELKIN et al., 1998; KAVALIERS *et al.*, 2001).

Existe uma enorme heterogeneidade nos receptores serotoninérgicos devido ao grande número de isoformas, e a maior parte dos dados atualmente disponíveis provém de modelos *in vitro*, permanecendo o desafio de revelar os mecanismos de ação destes subtipos de receptores em modelos *in vivo* (PAUWELS, 2000).

Além da simplicidade inerente ao método, por razões éticas e filosóficas, há uma tendência para que se estimule a pesquisa em modelos invertebrados, em detrimento de modelos vertebrados, especialmente mamíferos (STEVENS, 1992).

A escolha do gastrópodo pulmonado *M. oblongus* (MÜLLER, 1774) para modelo experimental, nos Laboratórios de Histofisiologia Comparada e Neurobiologia Comparada (ICBS – UFRGS), tem sido atenciosamente considerada, sendo realizada uma série de estudos visando responder algumas questões como:

- a. **Ciclo reprodutivo** (HORN *et al.*, 1995);
- b. **Inervação e corpo dorsal** (ZANCAN & ACHAVAL, 1995)
- c. **Anatomia e vascularização do SNC** (PERES, 1994; NÓBLEGA *et al.*, 2000)
- d. **Histoquímica e imunohistoquímica (óptica e ultra-estrutural) do SNC:**
 - Atividade fosfatase ácida (DONELLI *et al.*, 1998)
 - Aminas biôgenas (ZANCAN *et al.*, 1997)
 - FRMFamida (MORIGUCHI-JECKEL, 2001)
 - GFAP (SANTOS *et al.*, 2000; 2001)

-Vimentina (SANTOS *et al.*, 2000; 2001)

- e. **Musculatura pediosa e plexo pedioso- caracterização histológica histoquímica, imunohistoquímica e ultra-estrutural** (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1995; FACCIONI-HEUSER, 1999; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 1999)
- f. **Barreira hemolinfática neural (óptica, ultra-estrutural e marcadores**
-(NÓBLEGA *et al.* 2000)
- g. **Estudos hodológicos** (PUPERI *et al.*, 2001; MALYSZ *et al.*, 2001; ZANCAN *et al.*, 2001; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2001)
- h. **Anóxia no SNC** (DE FRAGA *et al.*, 2001)
- i. **Estruturas sensoriais** (ZANCAN *et al.*, 2001)

OBJETIVOS

O estudo proposto tem por finalidade:

- Adequação deste animal para estudo em nocicepção (“dor”) aguda;
- Reconhecer elementos que sirvam de substrato para estabelecer possíveis homologias entre modelos vertebrados e invertebrados utilizados na pesquisa de dor e nocicepção;
- Determinação de um comportamento estereotipado no *M. oblongus* que seja indicativo de nocicepção, utilizando estimulação térmica aversiva, conforme o que foi descrito para outras espécies na literatura;
- Determinação da “latência” nas temperaturas ambiente, 45 e 50°C, visando estabelecer qual a melhor temperatura de trabalho em experimentos utilizando estímulos aversivos térmicos (“EATs”) nesta espécie.
- Estudos farmacodinâmicos comparados entre as curvas “dose-resposta” obtidas com a morfina, o naloxone, a 5-HT e a metisergida nesta espécie, observando-se os efeitos provocados por estas substâncias nas latências. Por sua vez, as modificações ocorridas nas latências indicam a presença de receptores para estes fármacos. Assim sendo, estudou-se os sistemas opióide e serotoninérgico, utilizando-se morfina e serotonina, bem como os seus respectivos bloqueadores, o naloxone e a metisergida.
- Otimização de um modelo que seja aplicável em trabalhos posteriores que empreguem a metodologia presentemente desenvolvida.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS: Procedência, Manutenção e Características

O modelo biológico utilizado neste estudo foi o caracol terrestre pulmonado *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774) Este é um molusco da classe Gastropoda sub-classe Pulmonata, ordem Stylomatophora, encontrado no sul do Brasil, Argentina e Paraguai (SAWAYA & PETERSEN, 1962; DE JORGE *et al.*, 1965). Estes caracóis são terrestres, hermafroditas, reproduzem-se e desenvolvem-se adequadamente em cativeiro. Habitam ambientes úmidos, protegidos pela vegetação e em condições de umidade relativa do ar muito baixa permanecem enterrados no solo. São ativos durante a noite, e durante o dia somente em situações de umidade relativa alta. A idade reprodutiva adulta parece iniciar-se aos dois anos de idade (JAEGER, 1965).

Para estudar o comportamento aversivo térmico, a determinação da latência, bem como os tratamentos farmacológicos com morfina, naloxone, 5-HT e metisergida, foram utilizados *Megalobulimus oblongus* adultos, caracterizados pela borda da concha virada e de coloração rósea, obtidos em Ipanema (Porto Alegre) e no município de Santa Cruz do Sul (RS). Os animais foram colocados em terrários deixados no local dos experimentos com temperatura controlada, no mínimo 3 semanas antes dos testes. As variações ambientais normais de fotoperíodo foram mantidas. Os animais foram alimentados com alface e água *ad libitum*. Os animais utilizados apresentavam uma faixa de peso de 45 a 92 g. Animais pesando menos de 40 g não foram empregados nos experimentos.

Desde que a atividade dos gastrópodos pode ser afetada pelo grau de hidratação, todos os espécimens foram mantidos hidratados antes da realização dos testes. Para isto, três horas antes de iniciar os experimentos, os animais eram

colocados isoladamente em caixas plásticas com tampa, medindo 265 mm x 214 mm x 152 mm com um “assoalho hídrico” formado por uma pequena quantidade de água (100 ml) (Figs 2b e 4a). Esta medida visava reproduzir a atmosfera saturada em umidade, propiciando níveis ótimos de hidratação e adequação do comportamento, com os espécimens fora de suas conchas e ativos, além de minimizar o “estresse de novidade” (KAVALIERS, 1993; ROMERO *et al.*, 1994). Foram considerados aptos para o teste com estímulo aversivo térmico (“EAT”) em placa metálica aquecida somente os animais que estavam fora das conchas.

Cada animal foi utilizado uma única vez para evitar a “sensibilização” por estímulos térmicos repetidos.

2 ESTÍMULO NOCICEPTIVO

2.1 ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO

Os investigadores devem avaliar os níveis de “nocicepção” fazendo um registro cuidadoso de um desvio no comportamento normal do animal (CASEY & DUBNER, 1989). A determinação de um padrão fixo de ação constitui-se em uma excelente sistemática para explorar os mecanismos neurais envolvidos no disparo e na modulação de comportamentos complexos. A resposta motora ocorrida logo após a exposição a um estímulo nociceptivo, é a manifestação comportamental mais usada como padrão algimétrico em animais (MACKEY & CAREW, 1983). Existe um consenso entre os pesquisadores em dor e analgesia, que um melhor entendimento dos mecanismos neurais envolvidos nestes fenômenos, são críticos para o

desenvolvimento de novos fármacos e outros procedimentos terapêuticos. Isto, porém, não deve servir de argumento para o uso indiscriminado de qualquer forma de estímulo doloroso sob todas as circunstâncias. Assim sendo, uma conduta mais humanizada é que o experimentador deve selecionar um método que inflija um estímulo doloroso menos intenso por um período o mais breve possível. Por esta razão, é que a maioria dos experimentos utiliza vários testes baseados no chamado “reflexo de retirada” (FRANKLIN & ABBOTT, 1989).

Este teste foi preconizado por Woolfe e MacDonald (1944), utilizando camundongos onde se variava a temperatura entre 45 e 70°C de uma placa de zinco, e observaram-se as respostas. Entre 45^o e 50°C, as respostas eram variáveis, no entanto entre 55^o e 60°C, todos os animais reagiram em um intervalo de 20 ou 30 s, primeiramente lambendo ou “soprando” suas patas dianteiras; poucos segundos após, passaram a “dançar” sobre suas patas traseiras, sendo este considerado um critério de “desconforto”. Para a aplicação do estímulo térmico em *Megalobulimus oblongus*, utilizou-se um aparelho composto por uma placa metálica com superfície lisa e aquecida, e temperatura monitorizada com termômetro (Slide Warmer, Chigago Surgical & Eletrical Co., Melrose Park Illinois; Fig. 2(A). Esta placa é semelhante à proposta por Dyakanova *et al.*(1995), onde utilizaram uma placa quente para trabalhos histológicos com uma superfície metálica ajustada a 38^oC.

2.2 DETERMINAÇÃO DA LATÊNCIA

A latência é definida como o período que vai desde a colocação do animal sobre a placa aquecida, até a manifestação de um comportamento estereotipado relacionado à nocicepção (ROMERO *et al.*, 1994).

Para a determinação do comportamento estereotipado aversivo térmico e a latência, foram utilizados 30 caracóis adultos divididos em 3 grupos (n=10) conforme descrito abaixo:

Grupo A- animais colocados na placa à temperatura ambiente (controles com o aparelho desligado);

Grupo B- animais colocados na placa com o equipamento ligado e regulado na temperatura de 45°C;

Grupo C- animais colocados na placa com o equipamento ligado e regulado na temperatura de 50°C.

O tempo do aparecimento das modificações comportamentais indicativas da "latência" foi monitorizado em segundos. Considerou-se o tempo de 200s como a latência máxima permitida nos testes com o equipamento desligado. Também foram avaliadas as manifestações motoras do pé e da rádula assim como a secreção de muco.

1 TRATAMENTOS COM FÁRMACOS QUE ATUAM NO SISTEMAS OPIÓIDE E SEROTONINÉRGICO

Nos experimentos com morfina, 5-HT e seus respectivos bloqueadores, naloxone e metisergida, considerou-se somente a abordagem farmacodinâmica, isto é, verificar os possíveis efeitos dos fármacos em *M. oblongus*, indicando a presença de sistemas opióide e serotoninérgico, bem como dos seus receptores no animal. Não foram realizados experimentos farmacocinéticos.

A via de aplicação de todos os fármacos foi intramuscular na região ventral do pé, empregando seringa para injeções de insulina graduadas em 1ml ou 10 UI.

Observou-se um período de 5 minutos antes de submeter os animais aos estímulos aversivos térmicos (EATs).

3.1 SISTEMA OPIÓIDE

3.1.1 SULFATO DE MORFINA

Para a aplicação do sulfato de morfina (Dimorf, Cristália), foram empregados 125 caracóis, distribuídos em 5 grupos (n = 25):

- Grupo A – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com sulfato de morfina a dose de 5 mg / kg.
- Grupo B – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com sulfato de morfina a dose de 10 mg / kg.
- Grupo C – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com sulfato de morfina a dose de 20 mg / kg.
- Grupo controle – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com solução salina 1 ml.
- Grupo sham – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C sem fármacos e sem solução salina.

3.1.2 CLORIDRATO DE NALOXONE

Foram utilizados um conjunto de 125 animais, divididos em 5 grupos (n= 25):

- Grupo A – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com cloridrato de naloxone a dose de 2,5 mg/ kg.
- Grupo B – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com cloridrato de naloxone a dose de 5,0 mg/ kg.
- Grupo C – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com cloridrato de naloxone a dose de 7,5 mg/ kg.
- Grupo controle – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com de solução salina 1 ml.
- Grupo sham – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C sem fármacos e sem solução salina.

3.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

3.2.1 HIDROCLORIDRATO DE 5-HIDRÓXI-TRIPTAMINA

Para este tratamento foram utilizados 125 caracóis, distribuídos em 5 grupos (n= 25), injetados com serotonina (Sigma) nas concentrações entre 10⁻⁷ e 10⁻⁴ utilizadas por Jaeger (1964) para produzir efeitos cardiotônicos em *Strophocheilus (Megalobulimus) oblongus*. A solução foi preparada dissolvendo-se 10 mg em 10 ml de solução salina; posteriormente, foram feitas titulações progressivas até serem obtidas as concentrações desejadas.

- Grupo A – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com serotonina a dose de 10⁻⁴ mg/ml.
- Grupo B – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com serotonina a dose de 10⁻⁵ mg/ml.
- Grupo C – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com serotonina a dose de 10⁻⁶ mg/ml.
- Grupo D – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com serotonina a dose de 10⁻⁷ mg/ml.
- Grupo controle – caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com 1 ml de solução salina.

3.2.2 MALEATO DE METISERGIDA

A influência de metisergida sobre a latência do comportamento aversivo após estímulo térmico foi testada primeiramente combinada com 5-HT para descartar a provável ação da metisergida sobre um sistema não serotoninérgico. Após a obtenção desses resultados se testou a ação de metisergida sobre o sistema serotoninérgico endógeno.

Para o tratamento com maleato de metisergida (Deserila – Novartis) foram utilizados comprimidos à concentração de 1 mg. Estes foram macerados e dissolvidos em 1 ml de solução salina, obtendo-se uma concentração de 1: 1. À partir desta, foram feitas diluições progressivas, que serviram como critério na divisão dos grupos a serem testados. Foram utilizados 150 animais em 2 grupos (n=

75) onde foram injetados metisergida e serotonina ou metisergida e solução salina. Pela sua vez cada grupo foi dividido em 3 sub-grupos (n=25) onde se manteve a mesma concentração de 5-HT ou 1 ml de salina e foi variável a concentração de metisergida.

3.2.2.1 METISERGIDA + SEROTONINA

- Sub-grupo A.1- caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com maleato de metisergida 10⁻⁴ mg/ml e 5-HT 10⁻⁴ mg/ml.
- Sub-grupo A.2- caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com maleato de metisergida 10⁻⁵ mg/ml e 5-HT 10⁻⁴ mg/ml.
- Sub-grupo A.3- caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com maleato de metisergida 2 x 10⁻⁴ mg/ml e 5-HT 10⁻⁴ mg/ml.

3.2.2.2 METISERGIDA + SOLUÇÃO SALINA

- Sub-grupo B.1- caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com maleato de metisergida 10⁻⁴ mg/ml e solução salina 1 ml..
- Sub-grupo B.2- caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com maleato de metisergida 10⁻⁵ mg/ml e 1 ml de solução salina.
- Sub-grupo B.3- caracóis colocados na placa quente a 50⁰C foram injetados previamente com maleato de metisergida 2 x 10⁻⁴ mg/ml e 1 ml de solução salina

2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados utilizou-se uma Análise da Variância (ANOVA) como os valores estudados encontravam-se dentro de uma curva normal de Gauss, realizou-se posteriormente a ANOVA o teste paramétrico de Tukey, sendo que considerava-se significativo um p menor que 0,05. Toda a análise estatística foi realizada no software SPSS 7.0. Os dados apresentados no texto representam a média e o erro padrão.

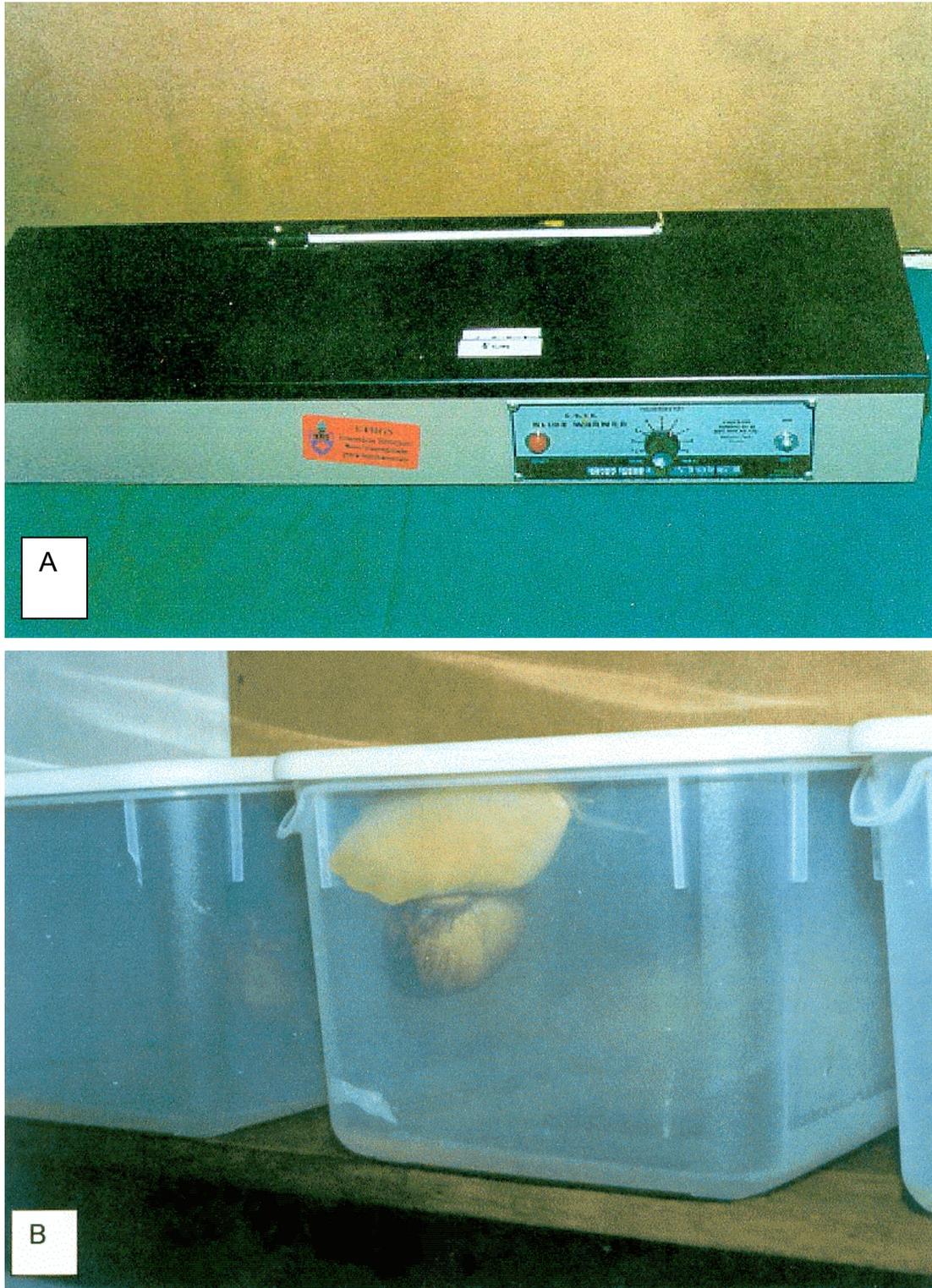


Figura 2 – Fotografias do equipamento utilizado nos experimentos com EAT (A) e os animais colocados individualmente nas caixas plásticas com “assoalho hídrico” (B).

RESULTADOS

1 COMPORTAMENTO AVERSIVO TÉRMICO

1.1 ANIMAIS COLOCADOS NA PLACA À TEMPERATURA AMBIENTE

Neste grupo de caracóis somente foi observado um comportamento exploratório, sem quaisquer modificações significativas nos padrões locomotores e de liberação de muco pela glândula supra-pediosa, idêntico aos padrões de comportamento observado nos terrários e nas caixas plásticas antes dos testes. No comportamento exploratório, não se verificou aumento na secreção de muco, agitação motora e alterações nos movimentos da rádula como extensão seguida imediatamente por retirada. O corpo do animal, e por conseguinte, seu campo receptivo, permaneceu em contato com a placa à temperatura ambiente durante todo o teste. (Figs. 3A e 3B).

1.2 ANIMAIS COLOCADOS NA PLACA QUENTE A 45⁰C E 50⁰C

Tanto a estimulação térmica a 45⁰C quanto a 50⁰C foram capazes de provocar modificações no comportamento motor, caracterizado pelo estado de agitação do animal, manobras de afastamento dos segmentos corporais ventrais em contato com a superfície aquecida e alterações nos movimentos da rádula. Neste segmento anatômico, verificou-se protusão e retração, semelhantes a “lambidas” seguidas imediatamente por retirada ao encostar na placa, enquanto no corpo ocorreu dorsiflexão em torno de 1 cm dos segmentos anteriores do pé, bem com a elevação menos pronunciada do segmento caudal e das bordas laterais. Estas

manifestações comportamentais foram bem mais exuberantes na temperatura de 50⁰C (Fig. 4A, 4B e 4C).

Nos caracóis estimulados a 50⁰C, o muco mostrou-se mais espesso, de coloração amarelo-esverdeada, ressequido e em quantidade menor quando comparados com os animais expostos a 45⁰C; nestes, a produção de muco foi mais abundante, com aspecto fluido e claro, e presença de estrias amareladas. Em todos os testes realizados nesta temperatura não se observou o padrão de muco espesso, ressequido e amarelo-esverdeado conforme observado a 50⁰ C. Além disso, em ambos a localização das maiores quantidades de muco foi na sola do pé, quando comparado aos outros segmentos corporais.

Ambos os grupos apresentaram diferenças significativas nas latências em relação aos animais controle, sendo que em todos animais controle analisados observou-se a latência máxima permitida de 200 segundos. Contudo, os animais submetidos a estimulação térmica na temperatura de 50⁰C ($X=72,0 \pm 4,3$ s), demonstraram uma latência significativamente menor quando comparado com os animais estimulados a 45⁰ C ($X=101,07 \pm 9,29$ s) (Fig. 5).

2 EXPERIMENTOS COM FÁRMACOS

2.1 ANIMAIS TRATADOS COM SULFATO DE MORFINA

A administração de morfina nas doses estabelecidas foi capaz de aumentar significativamente as latências em relação aos grupos controle e solução salina ($\alpha=0,05$). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os animais dos grupos tratados: 5mg ($X=110,3 \pm 5,1s$) ; 10mg ($X=124,5 \pm 9,5s$) 20mg ($X=113,3 \pm 6,1s$), tampouco quando comparados os grupos controle ($X=80,2 \pm 2,9s$) e sham ($X=74,4 \pm 4,5 s$) (Fig. 6).

Apesar das latências terem sido alteradas pela morfina, as respostas motoras consecutivas à estimulação táctil e punctória não se modificaram; o animal retraía imediatamente os segmentos corporais estimulados pela agulha da seringa.

Ao contrário, nos caracóis que receberam morfina, o muco foi espesso, ressequido e de coloração amarelo-esverdeada ou esverdeada (Fig. 7A), visível predominantemente na superfície ventral (Fig. 7B).

Sob efeito da morfina, os tentáculos apresentaram-se murchos e parcialmente retraídos; este fenômeno não foi observado nos grupos sham (solução salina) e controle. Com as maiores doses de morfina (10 e 20 mg/Kg), um certo prejuízo no comportamento motor foi observado, sendo caracteristicamente mais lento do que nos animais controle; nestes últimos, os tentáculos permaneceram túrgidos e eretos em todas as fases dos testes. Os movimentos pela rádula (“reflexos de retirada”) foram idênticos àqueles observados nos testes com EAT preliminares aos estudos farmacológicos, porém mais lentos (item 3.1.2).

2.2 ANIMAIS TRATADOS COM CLORIDRATO DE NALOXONE

Nos animais que receberam tratamentos com naloxone 2,5mg ($X=48,5 \pm 4,9s$); 5mg ($X=56,6 \pm 3,2s$) e 7,5mg ($X=56,0 \pm 5,3s$) verificou-se uma diminuição

significativa ($\alpha=0,001$) da latência com todas as doses preconizadas quando comparados aos animais do controle ($X=80,2 \pm 2,7s$), e ao grupo solução salina ($X=72,7 \pm 3,5s$). Não houve diferenças significativas nas latências entre os grupos tratados (Figura 8). Uma quantidade aumentada de muco, com aspecto de clara de ovo também foi observada quando os animais foram submetidos ao EAT; o padrão de liberação do muco não se limitou à sola do pé quando em contato com a placa quente, ocorrendo já nas caixas plásticas após a aplicação das injeções e antes dos testes, revestindo, praticamente, todo o corpo do animal. Nos grupos tratados com morfina, solução salina e controle, não se verificou este tipo de fenômeno. A exemplo do que ocorreu com a morfina, doses elevadas de naloxone (5,0 e 7,5 mg/kg) também interferiram no desempenho do comportamento motor. Em alguns casos, houve uma diminuição tão acentuada que provocou o recolhimento do caracol para dentro da concha; estes animais não puderam ser considerados para os experimentos. Como nos animais tratados com morfina, os tentáculos mostraram-se mais retraídos e murchos do que nos grupos controle e solução salina, e também não se verificaram outras modificações nos movimentos da rádula, além dos de retirada imediata quando em contato com a superfície aquecida (item 2.1).

2.3 ANIMAIS TRATADOS COM SEROTONINA

Nos experimentos com 5-HT demonstrou-se que esta substância, em todas as doses estabelecidas, foi capaz de diminuir significativamente as latências em relação aos grupos controle e solução salina, sendo que este efeito é mais pronunciado nas doses 10^{-6} mg/ml ($X=54,7 \pm 3,0s$); 10^{-5} mg/ml ($X=52,9 \pm 2,6s$) e 10^{-4}

4 mg/ml ($X=48,8 \pm 5,1s$) ($\alpha=0,001$) do que o obtido na dose de 10^{-7} mg/ml ($X=64,2 \pm 5,0s$) ($\alpha=0,05$) (Figura 9). Com 5-HT na dose de 10^{-4} mg/ml, isoladamente ou em combinação com a metisergida nas doses 10^{-6} e 10^{-5} mg/ml, observou-se um padrão motor atípico, caracterizado por hiperextensão do corpo e agitação motora iniciados logo após a injeção da substância ou na caixa plástica, aonde o animal foi mantido por cerca de 5 minutos antes da aplicação do teste aversivo. Outras peculiaridades relacionam-se com fasciculações (“ondas de movimentos”) musculares com padrão monotáxico anterógrado que, entretanto, não se traduziram em locomoção, aumento moderado na produção do muco, sendo este de aspecto fluido e claro. Elevação do corpo do animal – ainda dentro da caixa, iniciando alguns segundos após a injeção – hiperextensão e protusão tônicas da rádula e da cartilagem odontófora, tornando a boca bem saliente lembrando a posição dos lábios humanos ao executar um beijo. Um comportamento semelhante é descrito na literatura como “biting” em experimentos com gastrópodos para estudar as vias neurais implicadas no comportamento alimentar (KUPFERMANN *et al.*, 1991), (Figs. 10A, 10B e 10C).

As maiores quantidades de muco foram mais evidentes com a 5-HT empregada isoladamente do que quando associada a metisergida, ou então quando comparados com os animais receberam metisergida e solução salina. A quantidade de muco liberado também variou conforme as doses de 5-HT. Os caracóis tratados com 5-HT manifestaram latências diminuídas com todas as doses empregadas quando comparados com os controles. As variações mais evidentes foram com as doses situadas entre 10^{-6} e 10^{-4} mg/ml (Figs. 9, 11 e 12).

2.4 ANIMAIS TRATADOS COM MALEATO DE METISERGIDA

2.4.1 METISERGIDA + SEROTONINA

Nos grupos tratados com 5-HT e metisergida, verificou-se que esta última, quando empregada nas doses 10^{-4} mg/ml ($X=93,8 \pm 7,2s$) e 2×10^{-4} mg/ml ($X=102,5 \pm 12,0s$), foi capaz de anular os efeitos nociceptivos da serotonina a partir da concentração 10^{-4} mg/ml ($X=48,0 \pm 5,1s$) ($\alpha=0,001$) (Fig. 11).

A combinação de 10^{-4} mg/ml de 5-HT com metisergida nas doses 10^{-6} mg/ml ($X=48,2 \pm 3,6s$), e 10^{-5} g/ml ($X=67,1 \pm 5,5s$), embora não apresente uma diferença significativa quando comparada aos animais do controle 5HT 10^{-4} mg/ml no quesito latência, estas concentrações também proporcionaram a observação da hiperextensão do corpo e agitação motora iniciadas logo após a aplicação dos fármacos nestes animais, previamente a execução dos testes aversivos (Fig. 10A, 10B e 10C).

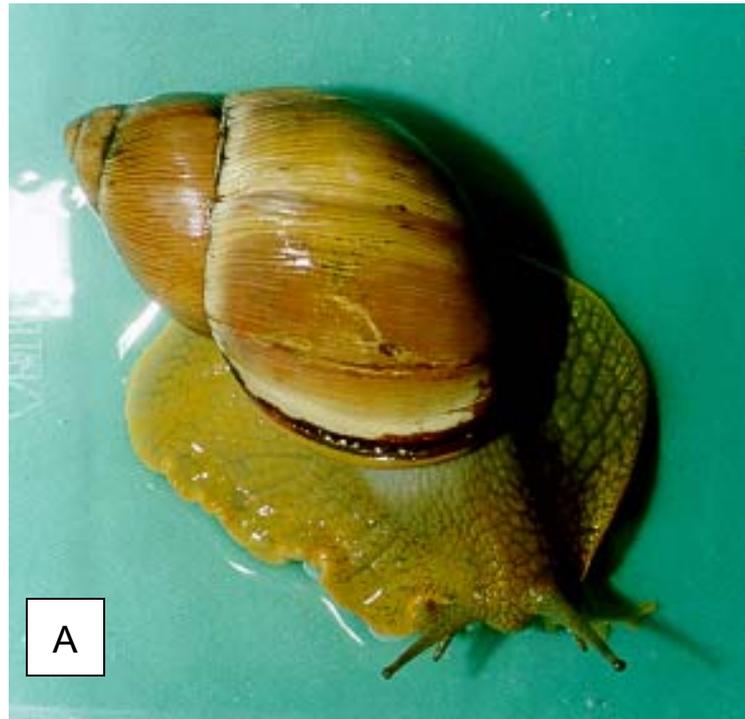
2.4.2 METISERGIDA + SOLUÇÃO SALINA

Quando observamos o quesito latência, todos os animais que foram submetidos ao tratamento com metisergida 10^{-6} mg/ml ($X=63,0 \pm 5,3s$); 10^{-5} mg/ml ($X=41,5 \pm 2,6s$); 10^{-4} mg/ml ($X=41,5 \pm 2,6s$); 2×10^{-4} mg/ml ($X=41,0 \pm 3,0s$) apresentaram latências significativamente menores quando comparados aos animais do controle ($X=80,1 \pm 2,7s$) e sham ($X=72,7 \pm 3,5s$) (Fig. 12).

O mesmo tipo manifestação (“BITING”) comportamental também foi observado com solução salina e metisergida 10^{-4} e 2×10^{-4} mg/ml, de modo dose-dependente. Também foi notada a presença de muco, variando de pouca a moderada quantidade, com aspecto claro e fluido, cuja distribuição foi mais visível

nos parapódios e segmentos ventrais; algumas vezes observaram-se poucas estrias amareladas nos segmentos ventrais (“campo receptivo”) do animal.

À exemplo do naloxone, também se verificou prejuízo motor dose-dependente nos caracóis tratados com metisergida 10^{-4} e 2×10^{-4} mg/ml. Paradoxalmente, alguns animais hiper-estenderam seus corpos, enquanto outros o encolheram.



Figuras 3A e 3B – Detalhes do componente exploratório quando o animal ainda estava na caixa plástica com o assoalho hídrico (A) e quando foi colocado sobre a placa desligada à temperatura ambiente (B). Em ambos, não foi observado o afastamento do campo receptivo do animal ou reflexos de retirada da rádula.



Figuras 4A, 4B e 4C – Seqüências de movimentos estereotipados, caracterizados pela elevação: dorsiflexão (A); reflexos de retirada da rádula (B) e lateralização dos segmentos corporais anteriores (C). Observa-se que há um afastamento dos segmentos ventrais (“campo receptivo”) em relação à placa aquecida.

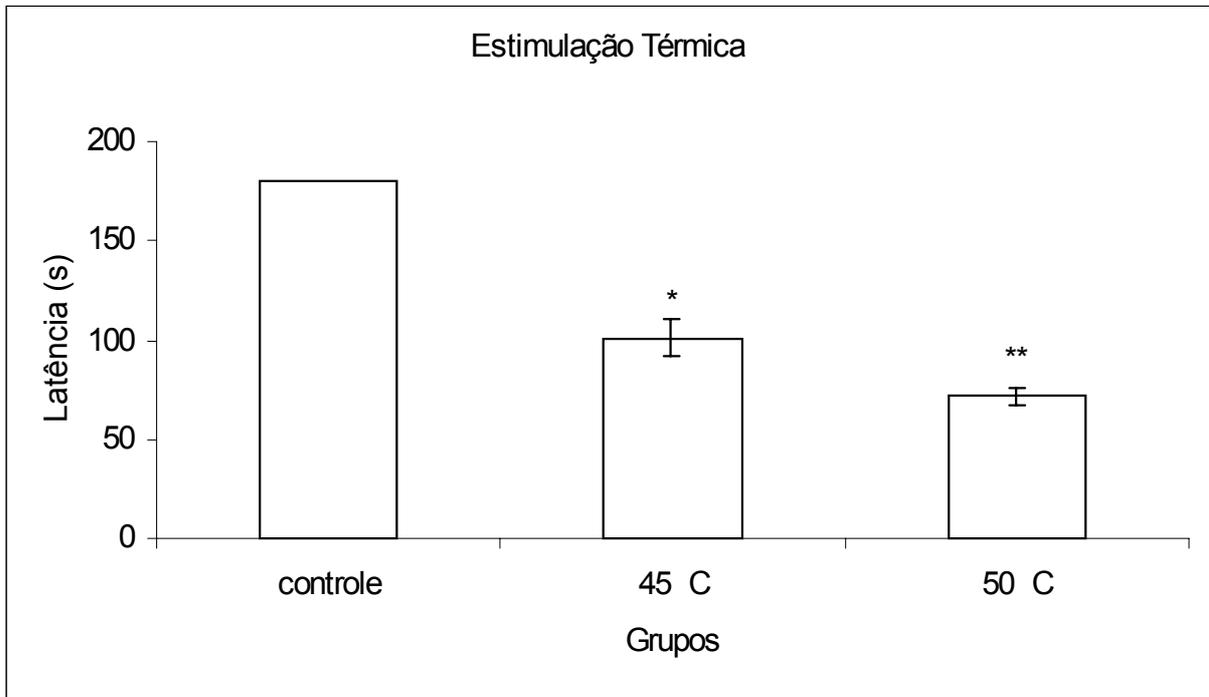


Figura 5 - As latências obtidas com os animais expostos ao EAT apresentaram diferenças estatisticamente relevantes em relação aos controles, sendo mais significativas com 50^oC; *p<0,05; **p<0,01.

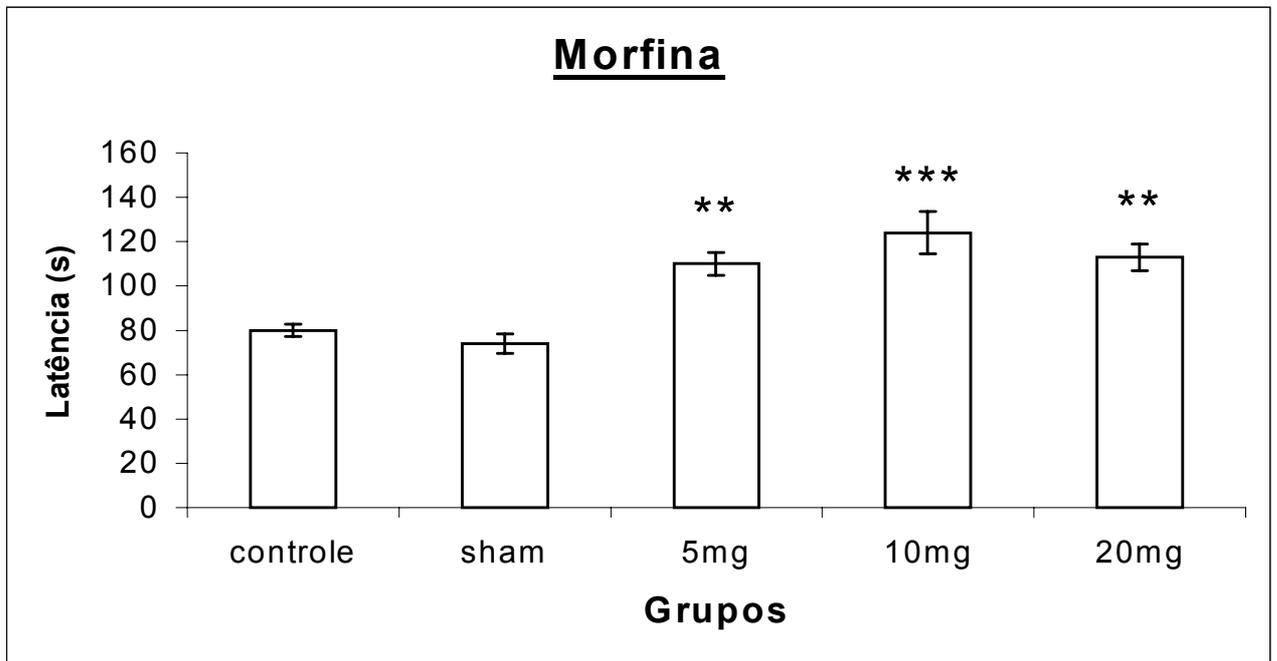
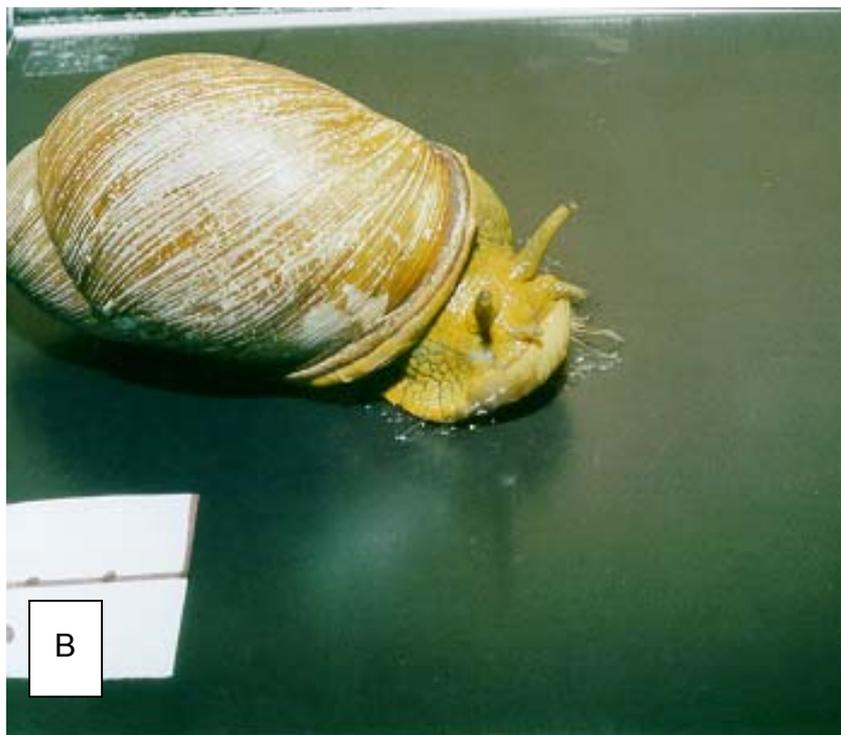
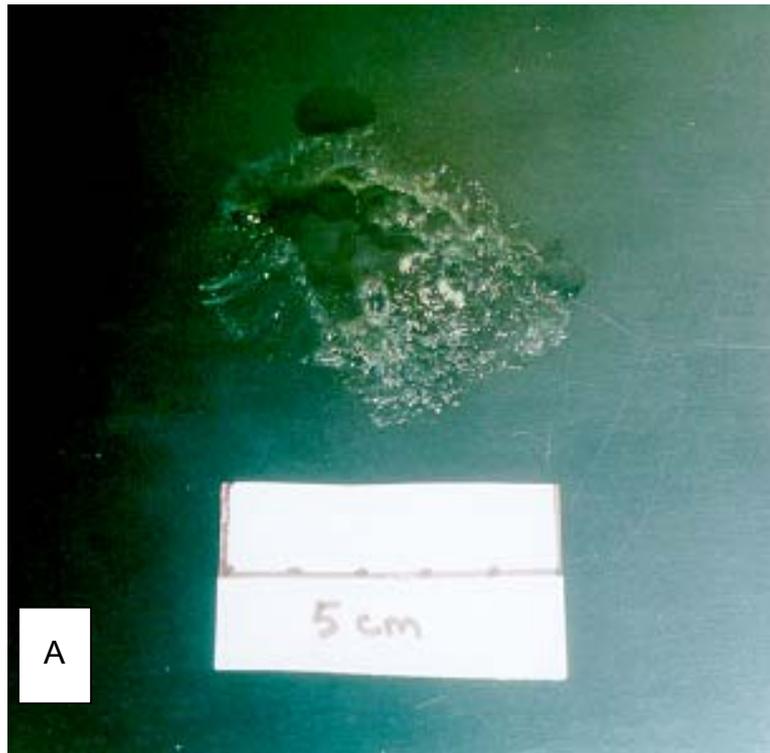


Figura 6 – Gráfico mostrando os efeitos da morfina nas doses 5, 10 e 20 mg, que foram significativos em relação aos grupos controle e sham.



Figs. 7A e 7B. Detalhe das características do muco liberado pelo animal tratado com morfina e submetido a estímulo aversivo térmico com placa aquecida à 50°C .

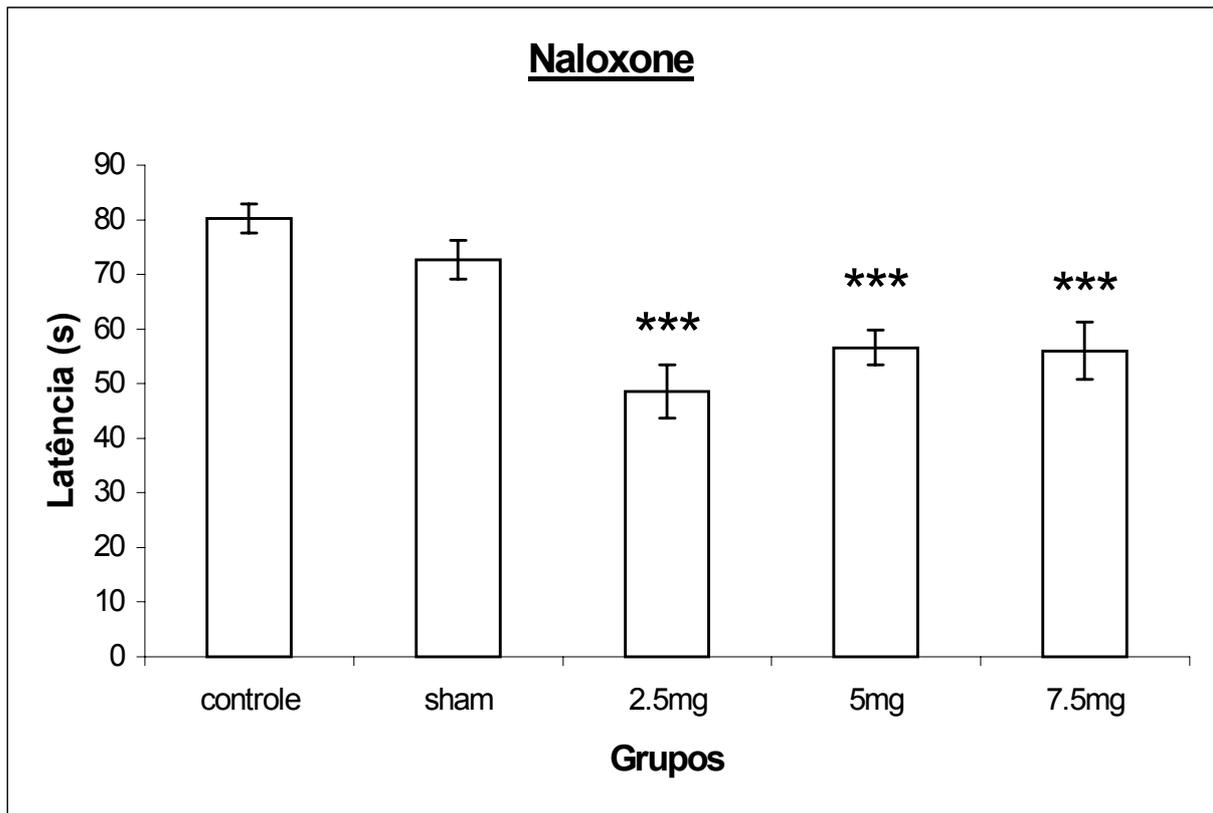


Figura 8 - O naloxone foi capaz de diminuir as latências nos animais expostos ao EAT em todas as doses empregadas, quando comparado com os grupos controle e sham. Não foram observadas diferenças entre os grupos tratados; *** $p < 0,001$.

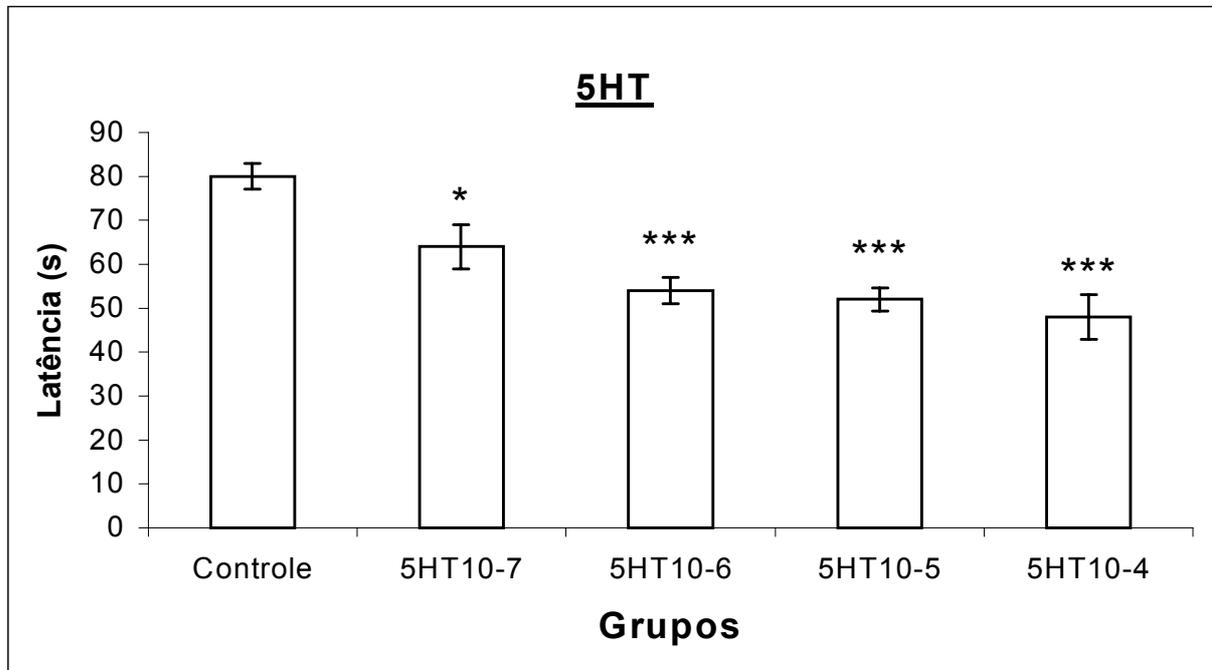


Figura 9 – Gráfico mostrando a diminuição das latências (efeito nociceptivo) provocadas pela 5-HT de modo dose-dependente; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

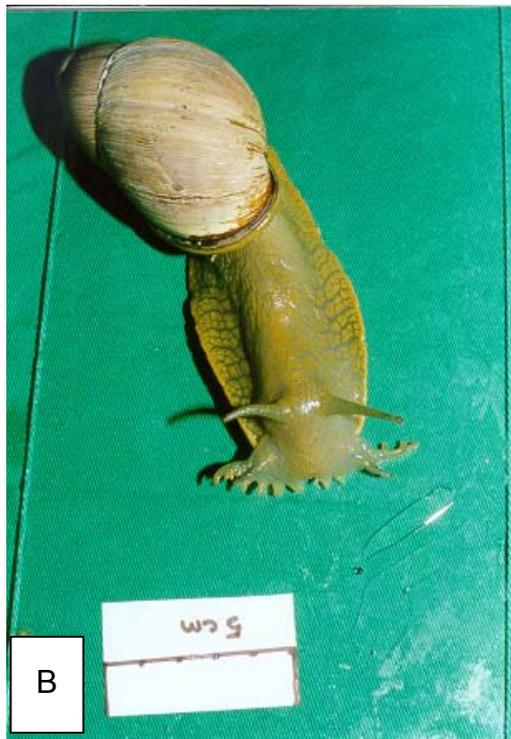


Figura 10A, 10B e 10C – Logo após a injeção de 5-HT, o animal hiperestendeu o corpo, contraindo e definindo os limites entre dois compartimentos musculares distintos, a musculatura pediosa e a dorso-medial, quando ainda estava na caixa plástica (A) ou fora dela sobre uma superfície não aquecida (B). Além disso, foram observados moimentos mioclônicos do tipo monotáxico direto que não produziram o deslocamento do animal, bem como a hiperextensão da rádula e estrutura bucais ou “biting” (C).

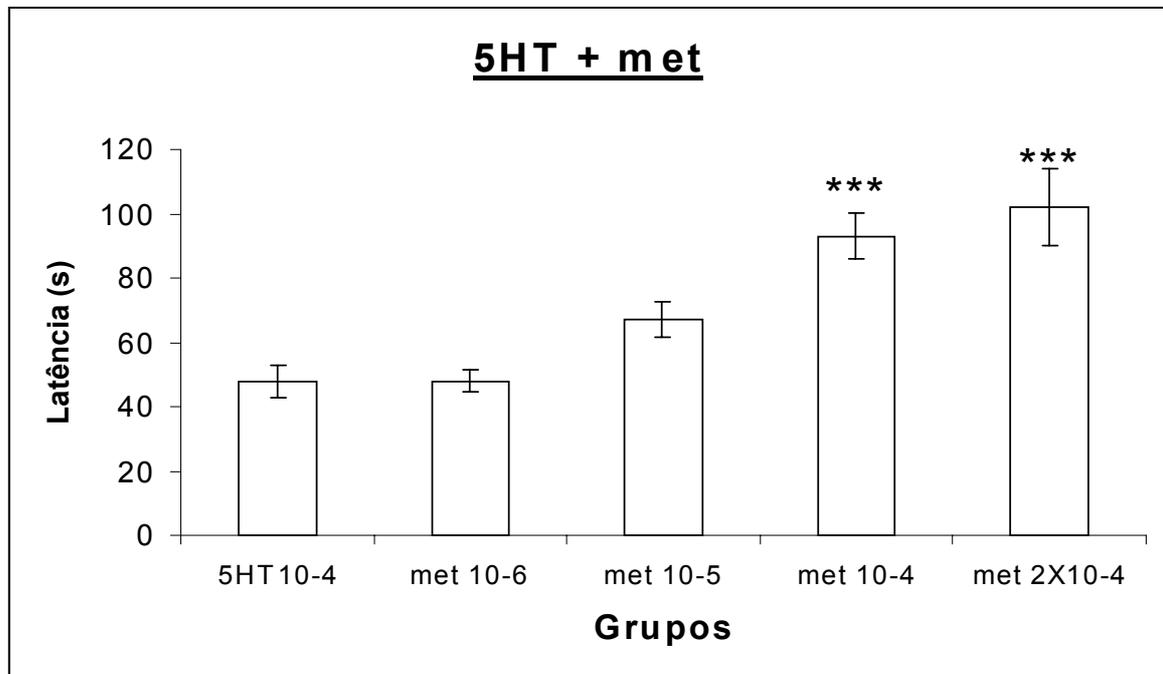


Figura 11 – As modificações nas latências causadas pela combinação 5-HT + metisergida foram observadas a partir da dose 10⁻⁵ mg/ml, aumentando de modo dose-dependente. Os dois fármacos aplicados juntamente produziram aumento na latência (efeito anti-nociceptivo); ***p<0,001.

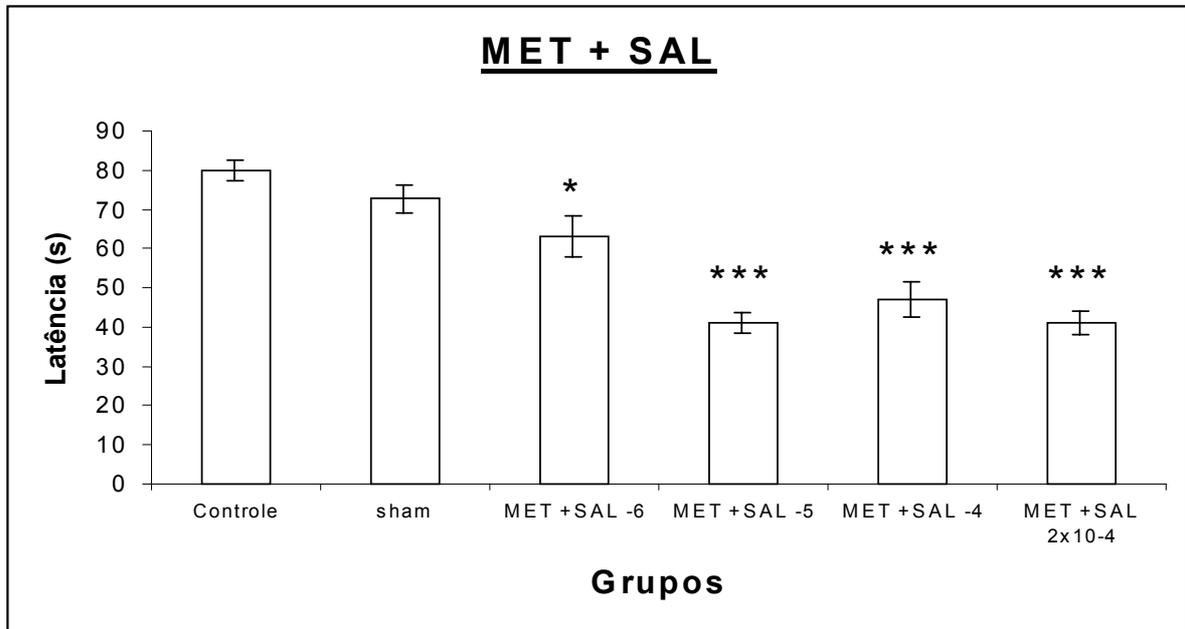


Figura 12 – Combinada com solução salina, a metisergida provocou diminuição da latência (efeito nociceptivo) dose-dependente, ao contrário do que foi observado quando associada a 5-HT; * $p < 0,05$; *** $< 0,001$.

DISCUSSÃO

1 ESTÍMULO AVERSIVO TÉRMICO E DETERMINAÇÃO DA LATÊNCIA

Os resultados obtidos com a utilização de estímulo térmico aversivo para a determinação de um comportamento estereotipado indicativo de nocicepção correspondem àqueles encontrados na literatura para outras espécies de gastrópodos (KAVALIERS & HIRST, 1985; KAVALIERS & OSSENKOPP, 1993; ROMERO *et al.*, 1994). Em *Cepaea nemoralis*, Kavaliers e cols. (1985), observaram uma elevação estereotipada da porção anterior do pé em extensão quando os caracóis plenamente hidratados foram colocados sobre a placa aquecida a 40°C, que não foi visto com a placa a temperatura ambiente. Já Dyakonova e cols. (1995), descreveram uma seqüência comportamental bifásica, incluindo a retração do animal para dentro das conchas, seguida pela protração e comportamento de busca. As manobras motoras realizadas pelo *Megalobulimus oblongus* quando expostos ao teste aversivo térmico, tais como agitação e dorsiflexão da cabeça e demais segmentos corporais anteriores, foram caracteristicamente observadas somente durante a estimulação aversiva, encontrando-se ausentes nos períodos pré e pós-teste, ou nos animais com a placa à temperatura ambiente. As manobras aversivas caracterizaram-se basicamente por movimentos nos quais o animal afasta o segmento ventral (“campo receptivo”) da superfície aquecida. Além disso, os movimentos da rádula quando em contato com a superfície aquecida podem ser perfeitamente descritas como “reflexos de retirada” que, somando-se à liberação atípica de muco, fornecem mais subsídios comportamentais para a identificação de um quadro aversivo.

Em vertebrados, a sensibilidade dos nociceptores polimodais à estímulos aversivos térmicos tem sido examinada (LEVINE *et al.*, 1980; JENSEN & YAKSH, 1984; MARTIN, 1984). Essas fibras possuem limiares que variam de 38^o a 49^o C, mas sempre exibindo sensibilidade máxima nas temperaturas situadas entre 45^o e 51^o C, aonde voluntários humanos referiram aumento na percepção dolorosa (LAMOTTE & CAMPBELL, 1978). Em *Limux maximus* (KAVALIERS & HIRST, 1985), as manobras aversivas ocorreram com a temperatura de 40±0,5^oC cerca de 10 segundos após a estimulação; em *Cepaea nemoralis* (KAVALIERS, 1987; KAVALIERS & OSSENKOPP, 1993; KAVALIERS *et al.*,1998), as temperaturas capazes de provocar estas manobras variaram de 38 à 40^oC, acontecendo cerca de 10 a 15 segundos após o EAT. Já no *Megalobulimus sanctipauli* (ROMERO *et al.* 1994), tais comportamentos foram evocados cerca de 6,8 a 8,3 segundos à temperatura de 52±1^oC. As manifestações comportamentais aversivas observadas no *Megalobulimus oblongus* ocorreram em um intervalo compreendido entre 55,1 a 144 segundos à temperatura de 45^oC, e entre 51,1 e 91,9 segundos à 50^oC nos animais não-tratados farmacologicamente.

Consideramos que as diferenças observadas entre os dados de literatura citados e os que foram observados em *M. oblongus* podem estar relacionadas com as temperaturas empregadas nestes experimentos. As latencias registradas no *M. oblongus* a 45^o e 50^oC são indicativos de uma influência “dose-dependente”, variando conforme a quantidade de calor aplicada.

Outra hipótese diz respeito a fatores de ordem espécie-específica. Segundo Kavaliers (1991), estudos realizados no *Cepaea nemoralis* com o objetivo de examinar a relação entre o polimorfismo exibido pelas conchas e o envolvimento do sistema opióide nos comportamentos de termorregulação e de preferencia térmica,

sugerem que a influência de fatores genéticos e ambientais pode ocorrer em populações naturais deste animal. Se existe correlação entre o polimorfismo das conchas em *M. oblongus* e os comportamentos anteriormente citados é uma questão a ser esclarecida através de experimentos subsequentes.

A “sensibilização” consecutiva à exposição do mesmo animal a estímulos aversivos térmicos repetidos, traduzida pela diminuição da latência, é um aspecto característico dos nociceptores que tem sido estudado em diferentes espécies incluindo invertebrados (LAMOTTE & CAMPBELL, 1978; NIKITIN & KOZYREV, 1996; 1999; SHEVELKIN, 1998). Essa é uma hipótese que pode ser testada no *M. oblongus* através de algumas adaptações na metodologia empregada no presente estudo. Por se tratar de uma forma de LTP (MAXIMOVA & BALABAN, 1984; EMPTAGE et al. 1996; NIKITIN & KOZYREV, 1999), experimentos que utilizem manobras aversivas como a “sensibilização” dos nociceptores resultante de EATs repetidos, podem fornecer mais informações à respeito dos mecanismos moleculares envolvidos em fenômenos como, por exemplo, dor crônica, habituação e desabituação, memória e aprendizado, sendo igualmente aplicáveis no modelo proposto.

As variações na espessura e coloração do muco são aspectos que devem ser salientados, levando-se em consideração as reações fisiopatológicas de resposta ao dano tecidual provocado pela aplicação de calor. O muco liberado pelo animal, principalmente a 50°C macroscopicamente descrito como “espesso”, “amarelado” ou “esverdeado”, merece uma análise cuidadosa dos seus constituintes bioquímicos e celulares, visando esclarecer até que ponto existe homologia neste tipo de resposta entre o *M. oblongus* e outras espécies, incluindo seres humanos. Os resultados obtidos em estudos no *Mytilus edulis* e no *Leucophaea maderae*

(STEFANO *et al.*, 1988), no *Lumbricus terrestris* (RENZZELLI-CAIN & KALOUSTIAN, 1995), no *Aplysia californica* (CLATWORTHY, 1996) e no *Planorbarius corneus* (SONETTI *et al.*, 1997), indicam que os sistemas nervoso (SN) e imune (SI) de invertebrados compartilham com mamíferos muitos dos mecanismos celulares básicos de respostas defensivas envolvendo estes sistemas. Nestes modelos experimentais, também se evidenciou a participação de neuropeptídeos opióides regulatórios na função de células imunocompetentes. Se essa possibilidade puder ser confirmada através de outros estudos com EAT no *Megalobulimus oblongus* ou em modelos *in vitro* utilizando material originário do seu SN, pode-se estabelecer um modelo experimental de “dor inflamatória” e de comunicação neuro-imune.

2 ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

2.1 SISTEMA OPIÓIDE

No estudo proposto confirma tanto a capacidade da morfina em produzir um aumento na latência da manifestação comportamental aversiva em *M. oblongus*, quanto do naloxone em diminuí-la, conforme foi descrito para outras espécies, incluindo vertebrados e invertebrados (O'CALLAGHANN & HOLTZMAN, 1975; WARIZI, 1976; LEVINE *et al.*, 1980; MARTIN, 1984; KAVALIERS & OSSENKOPP, 1993; KAVALIERS & HIRST, 1985; KAVALIERS, 1983; 1987; 1988; 1989; 1992; GUTIÉRREZ, 1991; ROMERO *et al.*, 1994). Os efeitos obtidos pela morfina e naloxone em *M. oblongus*, demonstra farmacologicamente a presença de receptores para um sistema opióide endógeno, como foi visualizado no estudo imuno-

histoquímico para detectar encefalinas no SN deste animal (ZANCAN, 1996; MORIGUCHI, 2001). Por sua vez, a presença deste sistema, sugere a sua participação em comportamentos termorregulatórios, preferência térmica e de respostas à temperaturas ambientais aversivas, como foi achado em *Cepaea nemoralis* (KAVALIERS *et al.*, 1983, 1985). Além disso, os experimentos desenvolvidos em *Arion ater* (DALTON & WIDDOWSON, 1989) e em *Cepaea nemoralis* (KAVALIERS & HIRST, 1986; KAVALIERS, 1987), sugerem uma forma de analgesia induzida por estresse, envolvendo peptídeos opióides, que é reversível pela ação da naloxona. Esse tipo de efeito antinociceptivo em *Megalobulimus oblongus* deve ser analisado em estudos posteriores.

Apesar dos resultados obtidos com a aplicação da morfina, algumas questões aguardam respostas, dentre as quais inclui-se o significado de “analgesia”. Ainda não está plenamente esclarecido, se as mudanças funcionais produzidas em modelos experimentais são homólogas àquelas observadas no tratamento da dor em seres humanos. A maioria dos testes medem o limiar de dor através de um estímulo nocivo; todavia, mudanças comportamentais não significam necessariamente analgesia. Outro ponto a ser considerado, é se o teste mede o limiar nociceptivo – quando o estímulo é percebido, ou se mede ou “tolerância”, quando o estímulo torna-se insuportável (FRANKLIN & ABOTT, 1989).

Em *Megalobulimus oblongus*, os experimentos utilizando o comportamento aversivo (“reflexo de retirada”) e a aplicação sistêmica de morfina não indicam se as manobras motoras ou os efeitos “analgésicos” desta substância devem-se à atuação do SNC, do SNP ou de ambos. Em *Aplysia*, os reflexos de retirada frente a estímulos aversivos compreende tanto elementos do SNC quanto do SNP (KUPFERMANN *et al.*, 1974; WRIGHT *et al.*, 1991; BUONOMANO *et al.*, 1992), o que também foi

sugerido por Dyakonova e cols. (1995) utilizando o *Cepaea nemoralis* em outros estudos. Até que ponto este tipo de manifestação comportamental depende de elementos periféricos ou centrais em *M. oblongus* é também é outra indagação cuja resposta depende de estudos posteriores.

Outro fato que deve ser ressaltado é que quando se avalia a eficácia analgésica de uma substância através de comportamento motor, torna-se importante diferenciar algo semelhante a uma paralisia muscular de uma resposta analgésica ou anti-nociceptiva propriamente dita (MARTIN, 1984; STEVENS, 1992). Conforme Kavaliers (1991), uma variabilidade aumentada nas respostas obtidas com doses elevadas de morfina (10mg/ml) em *Cepaea nemoralis* pode ser, em parte, atribuída à interferência no comportamento motor, tornando o animal mais lento (KAVALIERS, 1983). Em *Megalobulimus sanctipauli* (ROMERO *et al.*, 1994) uma atividade diminuída e a retração do animal para dentro da concha observada com doses elevadas de morfina também foi relacionada com prejuízo motor.

Existe razões para acreditar-se que alguns opióides são, ao mesmo tempo, antagonistas competitivos, agonistas parciais, ou fortemente agonistas, exercendo cada uma destas propriedades farmacológicas em receptores opióides diferentes. O termo “dualismo farmacológico” indica que a ativação de diversas vias neuronais através de mecanismos receptores diferentes resultam na mesma ação farmacológica. Diversos tipos de interação dose-resposta podem resultar dessa complexa relação quando doses graduadas de agonistas-antagonistas mistos, por exemplo, nalorfina, são administrados na presença de um agonista forte, por exemplo, morfina (MARTIN, 1984; MARTINDALE, 1998; DUGGAN & NORTH, 1984; GUTSTEIN & AKIL, 2001). Este fato pode explicar porque quando aplicado em doses altas, o naloxone apresenta diminuição nas latências de modo semelhante ao

apresentado pela morfina, restando ser esclarecido se tais modificações devam-se à efeitos anti-nociceptivos ou a prejuízo do comportamento motor.

A atividade analgésica da morfina e de narcóticos antagonistas foi testada em ratos por O'Callaghan e Holtzman (1975) empregando EAT "modificado", conforme a designação dada pelos autores. Eles utilizaram, respectivamente, as temperaturas 49,5^o e 54,5^o C, e concluíram que:

- a. os efeitos anti-nociceptivos da morfina à 49,5^o C foram significativamente maiores que à 54,5^o C;
- b. efeitos dose-relacionados em todos os narcóticos antagonistas testados à 49,5^oC, e somente com doses altas de pentazocina à 54,5^o C;
- c. o naloxone na dose de 3mg/kg antagonizou os efeitos anti-nociceptivos da morfina e de todos os narcóticos antagonistas, mas sem apresentar atividade com o teste H – P à 49,5^o C em doses tão altas como 30mg/kg
- d. uma temperatura menor com o teste aversivo térmico é recomendada para avaliação da atividade anti-nociceptiva de narcóticos antagonistas em ratos.

Estudos visando a reprodução destes resultados podem ser adaptados ao *M. oblongus*, empregando-se diferentes analgésicos opióides classificados conforme os seus diferentes graus de seletividade sobre os receptores μ , κ e σ .

A ação do naloxone em doses que antagonizam a ação inibitória dos opióides agonistas em mamíferos foi testada em determinadas células nervosas do *Helix aspersa*. O naloxone foi capaz de modificar o potencial de membrana de algumas células sem exposição prévia a opióides agonistas. Algumas células foram despolarizadas, enquanto outras foram hiperpolarizadas. A Met-Enk também foi efetiva para provocar mudanças nos potenciais de membrana de algumas células, e

falhou em outras, algumas das quais respondiam ao naloxone, sendo capazes de antagonizar parcialmente os efeitos do naloxone (GUTIÉRREZ, 1991, 1992).

Em vertebrados, o significado funcional dos peptídeos opióides aparenta ser muito mais amplo do que foi originalmente vislumbrado, e a expectativa de que a fisiologia dos opióides fosse semelhante à farmacologia destas substâncias parece inadequada. As inúmeras evidências citadas indicam que os peptídeos opióides possuem, dentre outras funções, um importante papel no controle da transmissão nociceptiva. Contudo, os resultados de experimentos com motoneurônios sugerem uma função não relacionada à percepção nociceptiva, mas possivelmente, ao comportamento após a lesão (DUGGAN & NORTH, 1984). Por essa razão, o papel desempenhado pelos peptídeos endógenos em modelos invertebrados parece assemelhar-se em termos de complexidade com a sua contraparte em mamíferos.

2.2 SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Os estudos farmacológicos e de biologia molecular aplicada à clonagem de receptores têm demonstrado a participação de diversos receptores e subtipos de receptores nas ações provocadas pela 5-HT (THADDEU 1998, SANDESRS-BUSH & MAYER, 2001)

Os efeitos observados nos animais tratados com 5-HT podem ser explicados, em parte, utilizando-se uma abordagem neuroanatômica e neuroquímica comparadas. Em experimentos morfológicos realizados em outros gastrópodes ficou estabelecido que existem circuitos neuronais serotoninérgicos responsáveis por comportamentos homeostáticos básicos, incluindo respostas a estímulos aversivos,

que são estruturalmente semelhantes entre as espécies estudadas (PERETZ & ESTES, 1974; KUPFERMAN *et al.*, 1991; McKENZIE *et al.*, 1998)

A presença de receptores 5-HT em *Megalobulimus oblongus* foi por nós confirmada farmacologicamente. Estes resultados foram confirmados neste caracol pela detecção de 5-HT em um estudo histofluorescente prévio, assim como pela injeção da neurotoxina agonista 5,7-di-hidróxi-triptamina (5,7-DHT) (ZANCAN *et al.*, 1997). A 5-HT injetada provocou alterações motoras e comportamentais idênticas às observadas com o 5,7-DHT (ZANCAN *et al.*, 1997). Além disso, a 5-HT causou modificações nas latências, como demonstram os resultados obtidos com os testes empregando EAT.

A ação de agonistas e antagonistas de receptores 5-HT foi estudada em *Helix aspersa* (BOYD *et al.*, 1985), utilizando preparações de músculo cardíaco. Os resultados dessas investigações indicam que os receptores cardíacos de *Helix* podem ser ativados por uma série de compostos que também interagem com receptores 5-HT no SN de vertebrados, possibilitando uma classificação própria para invertebrados, o que também tem sido sugerido por outros autores (WALCOURT-AMBAKEDEREMO & WINLOW, 1994; TIERNEY, 2001).

Quanto aos mecanismos de co-transmissão, Dyakonova e cols. (1995) realizaram experimentos em *Cepaea nemoralis*, com EAT, 5-HT, metisergida, Met-ENK e Leu-ENK, e observaram uma resposta motora bifásica, que incluía a retração do corpo animal para dentro da concha (primeira fase) seguida por protração e um comportamento de busca (segunda fase). Com a aplicação de metisergida, estes autores observaram efeitos opostos aos da 5-HT e das encefalinas na duração do estado de retração; o efeito da metisergida neste animal indica que as respostas

comportamentais induzidas por encefalinas, são, de alguma forma, dependentes da 5-HT endógena.

As diferenças encontradas nas latências entre os grupos 5-HT + metisergida (5-HT+met) e metisergida + solução salina (met+sal) podem ser explicadas através da ligação destas substâncias em receptores (ou subtipos de recetores) diferentes, da sua atuação distinta em receptores localizados só no SNP ou só no SNC, ou ainda, através de um mecanismo de co-transmissão envolvendo peptídeos opióides e 5-HT.

A metisergida aplicada isoladamente foi capaz de diminuir as latências de modo dose-dependente, produzindo um efeito nociceptivo, ao contrário do que foi observado quando associada a 5-HT, cujos efeitos nociceptivos foram anulados pela metisergida, sendo a resposta a metisergida dose-dependente. Esse tipo de resposta pode estar relacionada com o bloqueio da ação da 5-HT endógena sobre um tipo específico de receptor. Em *Lymnea stagnalis*, existem evidências de receptores 5-HT₂ homólogos aos de mamíferos (WALCOURT-AMBAKEDEREMO & WINLOW, 1994; TIERNEY, 2001). Em ratos submetidos ao teste de formalina, a ação de agonistas dos receptores 5-HT₂ e 5-HT₃, produziu um efeito antinociceptivo que foi antagonizado pelo pré-tratamento via intratecal com os antagonistas correspondentes (SASAKI *et al.*, 2001). Outro estudo visando avaliar o efeito antinociceptivo da 5-HT via intratecal utilizando modelos de dor crônica em ratos, sugerem que este NT pode não estar fortemente envolvido neste tipo de modulação, e que a limitada eficácia antinociceptiva da 5-HT nesses modelos deve-se a mecanismos mais complexos ainda por serem esclarecidos (BARDIN *et al.*, 2000).

Ao que tudo indica em *M. oblongus*, a metisergida isolada foi capaz de ligar-se antagônica e especificamente a um determinado tipo de receptor, facilitando a ação da 5-HT endógena sobre os demais tipos de receptores. Além disso, a aplicação exógena de 5-HT combinada a metisergida parece subsidiar esta possibilidade.

Virtualmente, todos os comportamentos requerem uma postura particular para serem executados, e por esta razão, um sistema postural neural pode ter um papel primário na atividade em muitas espécies, mesmo quando respostas posturais particulares variem muito entre diferentes espécies (KUPFERMANN *et al.*, 1991; McKENZIE *et al.*, 1998).

Em *Helisoma*, o comportamento alimentar envolve uma variedade de movimentos rítmicos de ingestão com três componentes básicos: uma estrutura faringeal chamada massa bucal, que consiste de 28 pares de músculos; uma cartilagem odontófora que situa-se na cavidade oral pelos músculos da massa bucal (MURPHY, 1990). Também tem sido demonstrado que respostas comportamentais podem ser evocadas por células individualmente ou por um pequeno grupo de células. Em *Aplysia*, um único par de neurônios cerebrais, identificados como C-PR, influenciam a atividade de numerosas células situadas nos gânglios pedal, cerebral e abdominal. O par C-PR geralmente produz excitação pura nos neurônios do gânglio cerebral envolvidos em comportamentos consumatórios. Estes neurônios incluem prováveis elementos de comando para "biting" (CBI-2), e células metacerebrais (MCCs). As MCCs são serotoninérgicas que modulam os músculos e neurônios que efetuam este fenômeno (KUPFERMANN *et al.*, 1991). A locomoção no *Aplysia* é mediada por um programa central que é disparado pela 5-HT (MACKEY & CAREW, 1983). Outros comportamentos motores, incluindo os reflexos de retirada

quando o animal é submetido a estímulos nociceptivos também são modulados por neurônios serotoninérgicos (WRIGHT & CAREW, 1995; GUNSTREAM *et al.*, 1995; EMPTAGE *et al.*, 1996; SHEVELKIN *et al.*, 1998). Aumentos da concentração de 5-HT de 10^{-7} a 10^{-4} mg/ml, produziu um aumento monotáxico direto no número de passos elicitados por um período cerca de 5 min após a injeção.

Portanto, as “ondas de movimentos” monotáxicas diretas e o “biting” presentes em *M. oblongus* após o tratamento com 5-HT, baseiam-se em um substrato anatômico-neuroquímico (gânglios pedais, inervação da massa bucal) semelhante ao encontrado em outros gastrópodes (KUPFERMAN *et al.*, 1991, ELEKES, 1991; MCKENZIE *et al.*, 1998), sugerindo que pelo menos alguns elementos responsáveis pela locomoção do animal e comportamento alimentar são serotoninino-dependentes. Por outro lado, a diminuição da latência provocada pela 5-HT, ao invés de um efeito nociceptivo, pode estar relacionada com um padrão motor aumentado.

Os resultados obtidos com a aplicação de 5-HT durante a exposição do *M. oblongus* ao EAT demonstrou que a substância foi capaz de diminuir significativamente as latências conforme a dose aplicada. Existem razões para se acreditar que o aumento da nocicepção manifestada por este animal quando tratado com 5-HT, cujo SN é mais bem simples que o de vertebrados, são semelhantes aquelas produzidas periféricamente pela 5-HT no SNP em animais complexos. A sensibilização dos nociceptores em mamíferos foi observada no SN de *Aplysia* e Hemissenda em experimentos conduzidos por Shevelkin e cols. (1998).

Os efeitos observados com a aplicação de metisergida podem ser explicados pelo fato desta substância ser um antagonista não-seletivo dos receptores 5-HT, apesar de exercer, algumas vezes, uma atividade agonista parcial em algumas

preparações (SANDERS-BUSH & MAYER, 2001). Resta saber quais são, especificamente, os receptores envolvidos nas respostas observadas no *M. oblongus.*, e qual o grau de homologia que pode ser estabelecido entre os seus receptores e o de outras espécies.

As várias ações fisiológicas mediadas pela 5-HT tanto em vertebrados quanto em invertebrados, pode ser explicado por sua ampla distribuição e pela multiplicidade de seus receptores (WALCOURT-AMBAKEDEREMO & WINLOW, 1994). Múltiplas cascatas bioquímicas mediadas por receptor podem ser ativadas de maneira diversa. Um agonista serotoninérgico não evoca necessariamente respostas com a mesma magnitude, sendo provável que atue seletivamente em várias vias de transdução de sinal. A sinalização gerada pelo receptor pode ser diversa via um único subtipo de receptor como consequência de interações específicas entre o agonista e um receptor tipo proteína G. Na verdade, os receptores 5-HT são muito heterogeneos quando se considera o fato de que a seqüência de amino-ácidos existente nos sub-tipos de receptores pode variar de indivíduo para indivíduo. Além disso, existe um grande número de isoformas de receptores em consequência de clivagens alternativas na transcrição do RNA do receptor. Isto implica que a atividade de um receptor com sítios de ligação com afinidades semelhantes pode apresentar diferentes propriedades farmacológicas (agonista pleno, agonista parcial, antagonista silencioso ou neutro – com atividade intrínseca próximo ao zero, e agonista inverso – também definido como antagonista negativo) dependendo da via efetora ou devido ao seu estado conformacional de ativação (PAUWELS, 2000)

CONCLUSÕES

As manifestações comportamentais em *Megalobulimus oblongus* após a estimulação aversiva térmica (EAT) foram analisadas, empregando-se teste com placa aquecida. Por outro lado, foram avaliados os efeitos da morfina e da serotonina (5-HT), bem como dos seus respectivos bloqueadores, o naloxone e a metisergida.

Com o procedimento utilizado (EAT), foi possível diferenciar um comportamento estereotipado indicativo de resposta reflexa a nocicepção. Ambas as estimulações térmicas (45⁰C e 50⁰C) mostraram-se efetivas para a elicitación do comportamento aversivo. Contudo, os resultados obtidos a 50⁰C foram mais pronunciados, caracterizando este valor térmico como o de maior acurácia para posteriores estudos de nocicepção neste modelo biológico.

O paralelismo obtido entre a antinocicepção (“analgesia”) induzida por opiáceos em estudos realizados em vertebrados, incluindo seres humanos, e os aumentos ocorridos nas latências com os caracóis tratados com morfina (“efeito antinociceptivo”) são indicativos de que o modelo experimental proposto também pode ser aplicável em estudos sobre opióides.

Além disso, tanto a 5-HT quanto a metisergida aplicadas isoladamente, provocaram uma diminuição da latência que foi relacionada com um efeito nociceptivo. Porém, quando estes dois fármacos foram aplicados conjuntamente, observou-se um efeito contrário.

Os resultados deste estudo sugerem o envolvimento de um sistema opióide e serotoninérgico nas respostas reflexas nociceptivas em *M. oblongus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, F. V. AND MELZACK, R., Brainstem lesions dissociate neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain, *Brain Res.*, 251: 149-155, 1982.
- ACHAVAL, M. *Expressão da proteína c-Fos no sistema nervoso central do rato, após estimulação nociceptiva periférica*. Tese de Doutorado, ICBS, UFRGS, 1991.
- ACHAVAL, M., PENHA, M.A., SWAROWSKY, A., ZANCAN, D.M. Estimulação aversiva térmica no caracol *Megalobulimus oblongus*. XVI Reunião Anual da FESBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.
- AMOROSO, E. C., F.R.S., BAXTER, M. I., CHIQUOINE, A. D. AND NISBET, R. H., The fine structure of neurons and other elements in the nervous system of the giant African land snail *Archantina marginata*, *Proc. Roy. Soc. B*, Vol. 160: 167-180, 1963.
- BAILEY, C. H., CASTELLUCCI, V. F., KOESTER, J. AND KANDEL, E. R., Cellular studies of peripheral neurons in siphon skin of *Aplysia californica*, *J. Neurophysiol.*, Vol. 42, N0.2, 1979.
- BARDIN, L., SCHMIDT, J., ALLOUI, A. ESCHALIER, A., Effects of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats, *Eur. J. Pharmacol.*, 409: 37-43, 2000.
- BASBAUM, A. I. and JESSEL, T. M., The perception of pain, in *Principles of Neural Science*, Fourth Edition, McGraw-Hill, 2000.
- BAXTER, D. A. AND BYRNE, J. H., Serotonergic modulation of two potassium currents in the pleural sensory neurons of *Aplysia*, *J. Neurophysiol.*, Vol. 62, N0.3, 1989.
- BEN-ARI, Y., Activity-dependent forms of plasticity, *J. Neurobiol.*, Vol. 26, N^o 3, pp. 295-298, 1995.
- BENJAMIN, P. R. and INGS, C. T., Golgi-Cox studies on the central nervous system of a gastropod mollusc, *Z. Zellforsch*, 128: 504-582, 1972.
- BENTLEY, G. A., NEWTON, S. H. and STARR, J., Studies on the antinociceptive action of α -agonist drugs and their interactions with opioid mechanisms, *Br. J. Pharmacol.*, 79: 125-134, 1983.
- BESSOU, P. and PERL, E. R., Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibres to noxious stimuli, *J. Neurophysiol.*, 32: 1025 – 1043, 1969.
- BLOOM, F., Neurotransmitters: past, present and future directions, *FASEB J.*, 2: 32-41, 1988.
- BOWLBY, J., *Apego, Separação e Perda*, Vol. I, Ed. Martins Fontes, 1984.

- BOYD P. J. and Walker R. J. Actions of the molluscan neuropeptide FMRF-amide on neurones in the suboesophageal ganglia of the snail *Helix aspersa*. *Comp Biochem Physiol C*; 81(2):379-86, 1985
- BROWN, A. G., The dorsal horn of the spinal cord, *J. Exp. Physiol.*, 67: 193-212, 1982.
- BUONOMANO, D. V., CLEARY, L. J. and BYRNE, J. H., Innibitory neuron produces heterosynaptic inhibition of the sensory-to-motor neuron synapse in *Aplysia*, *Brain Res.*, 577: 147-150, 1992.
- CAMPBELL, J. N., MEYER, R. A. and LaMOTTE, R. H., Sensitization of myelinated nociceptive afferents that innervate monkey hand, *J. Neurophysiol.*, 42: 1669 – 1679, 1979.
- CASEY, K. L. and DUBNER, R., Animal models of chronic pain: scientific and ethical issues, *Pain*, 38: 249-252, 1989.
- CLATWORTHY, A. L., A simple systems approach to neural-immune communication, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 115 A, N°1, pp. 1-10, 1996.
- COGGESHALL, R. E., ZHOU, S. and CARLTON, S. M., Opioid receptors on peripheral sensory axons, *Brain Res.*, 764: 126-132, 1997.
- COLE, S. A., SARAVAY, S. M. and LEVINSON, R. M., The biopsychsocial model in medical practice *in Human Behavior: an introduction for medical students*, Stoudemire, A., Third edition, Lippincott-Raven, 1998.
- CURRY, W. J., SHAW, C., JOHNSTON, C. F., THIM, L. and BUCHANAN, K. D., Neuropeptide F: primary structure from the tubellarian, *Artioposthia triangulata*, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 101 C, N0.2, pp. 269-274, 1992.
- DALTON, L. M. and WIDDOWSON, P. S., The involvement of opioid peptides in stress-induced analgesia in the slug *Arion ater*, *Peptides*, Vol. 10, N°1, pp. 9-13, 1989.
- DARWIN, C., *A expressão dos sentimentos nos homens e nos animais*, Ed. Companhia das Letras, 1998.
- DE FRAGA, L., DIAS, G.S., SILVA, R.S.M. da, ACHAVAL, M., ZANCAN, D.M. Quantificação do glicogênio do sistema nervoso central do caracol *Megalobulimus oblongus*. XVI Reunião Anual da FESBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.
- DE JORGE, F. B., CINTRA, A. B. V., HAESER, P. E., SAWAYA, P., Biochemichal studies on the snail *Stophocheilus oblongus musculus* (Becuaert), *Comp. Biochem. Physiol.*, 14: 35 – 42, 1965.

- DONELLI, D. C., ZANCAN, D. M., FACCIONI-HEUSER, M. C., ACHAVAL, M., Localization of acid phosphatase activity in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1774), *Braz. J. Morphol. Sci* 15: 78-83, 1998
- DUBNER, R. and BENETT, G. J., Spinal and trigeminal mechanisms of nociception, *Ann. Rev. Neurosci.*, **6**: 381-418, 1983.
- DUGGAN, A. W. and NORTH, R. A., Eletrophisyology of opioids, *Pharmacol. Rev.*, Vol. 35, N°4, 219-281, 1984.
- DULIN, M. F., STEFFENSEN, I., MORRIS, C. E. and WALTERS, E. T., Recovery of function, pheripheral sensitization and sensory neurone activation by novel pathways following axonal injury in *Aplysia californica*, *The Journal of Experimental Biology*, 198: 2055 – 2066, 1995.
- DYAKONOVA, V., CARLBERG, M., SAKHAROV, D. and ELOFSSON, R., Anatomical basis for interactions of enkephalis with other transmitters in the CNS of a snail, *J. Comp. Neurol.*, Vol. 361 N° 1, pp. 38-47, 1995.
- DYAKONOVA, V. E, ELOFSSON, R., CALBERG, M. and SAKHAROV, D. A., Complex avoidance behavior and its neurochemical regulation in the land snail *Cepaea nemoralis*, *Gen. Pharmac.*, Vol. 26, NO. 4, pp. 773-777, 1995.
- ELEKES, K., Serotonin-immunoreactive varicosities in the cell body region and neural sheath of the snail, *Helix pomatia*, ganglia: and electron microscopic immunocytochemical study, *Neuroscience* , Vol. 42, NO. 2, pp 583 – 591, 1991.
- EMPTAGE, N. J., MAUELSHAGEN, J., MERCER, A. and CAREW, T. J., Pharmacological dissociation forms of synaptic plasticity in the marine mollusc *Aplysia*, *J. Physiol.* 90: 385 – 386, 1996.
- EWADINGER, N. M., RIDGWAY, R. L., SYED, N. I., LUKOWIAK, K. and BULLOCH, A. G. M., Identification and localization of a [Met⁵]-enkephalin-like peptide in the mollusc, *Lymnaea stagnalis*, *Brain Res.*, 737: 1 – 15, 1996.
- ESSAWY, A. E., The neural organization of the paired pedal ganglia of the desert snail *Eremina ehrenbergi*, *Func. Develop. Morphol.*, Vol. 4, NO.1, pp. 9 – 15, 1994.
- FACCIONI-HEUSER, M. C., ZANCAN, D., M., LOPES, C. Q. and ACHAVAL, M., The pedal muscle of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata): na ultrastructure approach, *Acta Zool. (Stockholm)* 80: 325 – 327, 1999.
- FACCIONI-HEUSER, M.C., PUPERI, C., MALYSZ, T., ZANCAN, D.M., ACHAVAL, M. Neurônios do gânglio pedal envolvidos na inervação da musculatura pedioosa do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus*. XVI Reunião Anual da FESBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.

- FACCIONI-HEUSER, M.C., PEREIRA DOS SANTOS, P.C., GEHLEN, G., PUPERI, C., ACHAVAL, M. Filamentos intermediários de células gliais de *Megalobulimus oblongus*: análise imuno-histoquímica ao nível eletrônico. XVI Reunião Anual da FESBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.
- FADIMAN, J. e FRAGER, R., Teorias da Personalidade, Ed. Harbra Ltda., São Paulo, 1986.
- FIORI, A. M. C. and JAEGER, C. P., Biomass estimation of a stylomatophoran snail, *Rev. Bras. Biol.*, 38(4): 847 – 849, 1978.
- FRANKLIN, K. B. J. and ABBOTT, F. V., Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses, in Boulton, A. A., Baker, G. B. and Greenshaw, A. J., *Neuromethods Psycopharmacology*, Clifton, New Jersey, Human Press, 1989.
- FRANKSTEIN, S. I., Acute injury, inflammation and pain, *Experimental Neurology*, 72: 708 – 709, 1981.
- GARDNER, P. J., C. R. BOYD and WALKER, R. J., Actions of some 5-hydroxytryptamine analogues on the isolated heart of the snail *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 81 C, N0.1, pp. 233 – 239, 1985.
- GERLOFF, J., Optimization of methods and models in clinical pharmacology, *Journal of Clinical Pharmacology* (supplement), 1997.
- GRANZOW, B. and ROWELL, C. H. F., Further observations on the serotonergic cerebral neurones of *Helisoma* (*Mollusca, Gastropoda*): The case of homology with the metacerebral giant cells, *J. Exp. Biol.*, 90: 283-305, 1981.
- GUTIÉRREZ, R. and ASAI, M., IR-met and IR-leu-enkephalin content in the perioesophageal ganglia of *Helix aspersa* seasonal variations, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 100 C, N0.3, pp. 609 – 613, 1991.
- GUTIÉRREZ, R., Effects of naloxone on membrane potential of identified neurons of *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 101 C, N^o.2, pp. 425 – 431, 1992.
- GUTSTEIN, H. B. and AKIL, H., Opioid Analgesics in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman, J. G., Limbird, L. E. and Gilman, A. G., Tenth edition, McGraw-Hill, 2001.
- HADJICONSTANTINO, M., PANULA, P., LACKOVIC, Z. and NEFF, N. H., Spinal cord serotonin: a biochemical and immunohistochemical study following transsection, *Brain Res.*, 322: 245 – 254, 1984.
- HERNÁDI, L. and ELEKES, K., Peptidergic and aminergic centers in the Helix cerebral ganglia: somatotopy and immunocytochemistry, *Acta Biol. Hung.* 44(1): 89 – 92, 1992.

- HEYER, C. B., KATER, S. B. and KARLSSON, U. L., Neuromuscular systems in molluscs, *Amer. Zool.*, 13: 247 – 270, 1973.
- HORN, A. C. M., Ciclo reprodutivo do gastrópodo pulmonado *Megalobulimus oblongus*. Trabalho de finalização de curso de bacharelado em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências, UFRGS, 1994.
- HUNSKAAR, S. and HOLE, K., The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain, *Pain* 30: 103 –114, 1987.
- JAEGER, C. P., Action of acetylcholine on the heart of *Strophocheilus oblongus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, 4:30 – 32, 1961.
- JAEGER, C. P., Physiology of mollusca-IV. Action of serotonin on the penis retractor muscle of *Strophocheilus oblongus*, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 8, pp. 131 – 136, 1963.
- JAEGER, C. P., Giant snail is used for muscle studies, *Nat. Hist.*, 74: 26 – 27, 1965.
- JAEGER, C. P. and FARIAS, S. E., Action of methoxytryptamine and MAO inhibitors on the heart and penis retractor muscle of *Strophocheilus oblongus* (gastropoda, pulmonata), *Rev. Bras. Biol.*, 37(4): 859 – 862, 1977.
- JENSEN, T. S. and YAKSH, T. L., Effects of an intrathecal dopamine agonist, apomorphine, on thermal and chemical evoked noxious responses in rats, *Brain Res.*, 296: 285 – 293, 1984.
- KARLSSON, U. L., Neuromuscular systems in molluscs, *Amer. Zool.*, 13: 247 – 270, 1973.
- KAPLAN, H., SADOCK, B. e GREBB, J. A., *Compêndio de Psiquiatria: Ciências do Comportamento e Psiquiatria Clínica*, 7ª edição, Ed. Artes Médicas, 1997.
- KATAYAMA, Y., WATKINS, L. R., BECKER, D. P. and HAYES, R. L., Non-opiate analgesia induced by carbachol microinjection into the pontine parabrachial region of the cat, *Brain Res.*, 296: 263-283, 1984.
- KATZ, P. S. and FROST, W. N., Intrinsic neuromodulation in the *Tritonia* swim CPG: the serotonergic dorsal swim interneurons act presynaptically to enhance transmitter release from interneuron C2, *J. Neurosci.*, 15(9): 6035 – 6045, 1995.
- KAVALIERS, M., HIRST, M. and TESKEY, G. C., A functional role for an opiate system in snail thermal behavior, *Science*, Vol. 220, 1983.
- KAVALIERS, M., HIRST, M. and TESKEY, G. C., The effects of opioid and FMRF – amide on thermal behavior in the snail, *Neuropharmacology* Vol. 24, N0. 7, pp. 621- 626, 1985.

- KAVALIERS, M. and HIRST, M., Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the slug *Limax maximus*, *Life Sci.*, Vol. 38, pp. 203 – 209, 1985.
- KAVALIERS, M., Evidence for opioid and non-opioid forms of stress-induced analgesia in the snail, *Cepaea nemoralis*, *Brain Res.*, 410: 111 – 115, 1987.
- KAVALIERS, M., Novelty-induced opioid analgesia in the terrestrial snail *Cepaea nemoralis*, *Physiology & Behavior*, Vol. 42, pp. 29 – 32, 1988.
- KAVALIERS, M., Evolutionary aspects of the neuromodulation of nociceptive behaviors, *Amer. Zool.*, 29: 1345 – 1353, 1989.
- KAVALIERS, M., Opioid systems, behavioral thermoregulation and shell polymorphism in the land snail, *Cepaea nemoralis*, *J Comp Physiol B* 162: 172-178, 1992.
- KAVALIERS, M. and OSSENKOPP, K. P., Repeated naloxone treatments and exposures to weak 60-Hz magnetic fields have “analgesic” effects in snails, *Brain Res.*, 620: 159 – 162, 1993.
- KAVALIERS, M., CHOLERIS, E., PRATO, F. S. and OSSENKOPP, K. P., Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail, *Brain Res.*, 809: 50-57, 1998.
- KAR, S., GIBSON, S. J., SCARAVILLI, F., JACOBS, J. M. and ABER, V. R., Reduced numbers of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and tachykinin-immunoreactive sensory neurones associated with greater enkephalin immunoreactivity in the dorsal horn of a mutant rat with hereditary sensory neuropathy, *Cell Tissue Res.*, 255: 451-466, 1989.
- KERKUT, G. A., WOODHOUSE, H. and NEWMAN, G. R., Nerve-muscle junction in the snail *Helix aspersa*, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 19, pp. 309-311, 1966.
- KOBIERSKI, L. A., BELTZ, B. S., TRIMMER, B. A. and KRAVITZ, E. A., FMRFamide-like peptides of *Homarus americanus*: distribution, immunocytochemical mapping and ultrastructural localization in terminal varicosities, *J. Comp. Neurol.*, 266: 1-15, 1987.
- KUPFERMANN, S. C. R., TEYKE, T., MILLER, M. W., NAGAHAMA, T., CROPPER, E. C., HOOPER, S., VILIM, F. S. and WEISS, K. R., Feeding behavior in the sea hare *Aplysia californica*: a model for neural and behavioral study of behavioral states in *Molluscan Neurobiology*, Kits, K. S., Boer, H. H. and Joosse, J., pp. 12-24, North-Holland, Amsterdam / Oxford / New York, 1991.
- LAMOTTE, R. H. and CAMPBELL, J. N., Comparison of responses of warm and nociceptive C-fibers afferents in monkey with human judgments of thermal pain, *J. Neurophysiol.*, pp. 381-415, 1978.

- LEONARD, J. L., MARTINEZ-PADRON, M., EDSTROM, J. P. and LUKOWIAK, K., Does altering identified gillmotor neuron activity alter gill behavior in *Aplysia*? in *Molluscan Neurobiology*, Kits, K. S., Boer, H. H. and Joosse, J., pp. 30-37, North-Holland, Amsterdam / Oxford / New York, 1991.
- LEUNG, M. and STEFANO, G. B., Isolation and identification of enkephalins in pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Mollusca), *Proc. Natl. Acad. USA*, Vol. 81 pp 955 – 958, Feb. 1984
- LEUNG, M. K. and STEFANO, G. B., Comparative neurobiology of opioids in invertebrates with special attention to senescent alterations, *Progress in Neurobiology*, Vol. 28, pp. 131-159, 1987.
- LEVINE, J. D., MURPHY, D. T., SEIDENWURM, D., CORTEZ, A. and FIELDS, H. L., A study of the quantal (all-or-none) change in reflex latency produced by opiate analgesics, *Brain Res.*, **201**: 129 – 141, 1980.
- LI, K. W. and GERAERTS, P. M., Isolation and chemical characterization of a novel insulin-related neuropeptide from the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*, *Eur. J. Biochem.*, 205: 675-678, 1992.
- LIKAR, R., SITTL, R., GRAGGER, K., PIPAM, W., BLATNIG, H., BRESCHAN, C., SCHALK, H. V., STEIN, C. and SCHÄFER, Peripheral morphine analgesia in dental surgery, *Pain*, 76: 145 – 150, 1998.
- LINDBLOM, U. and VERRILLO, R. T., Sensory functions in chronic neuralgia, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, **42**: 422 – 435, 1979.
- LISBERGER, S. G., A mechanism of learning found, *Current Biology*, Vol. 5 N^o 3, pp. 221-224, 1995.
- LUKOWIAK, K. and PERETZ, B., The interaction between the central and peripheral nervous systems in the mediation of gill withdrawal reflex in *Aplysia*, *Physiology - A*, 1977.
- MACHADO, A., Neuroanatomia Funcional, 2^a edição, Ed. Atheneu, B. Horizonte, 1998.
- MACKEY, S. and CAREW, T. J., *J. Neurosci.*, Vol. 3, N0.7, pp. 1469 – 1477, 1983.
- MAINS, R. E. and EIPPER, B. A., Peptides in *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, Siegel, G. J., Agranoff, B. w., Albers, R. W., Fischer, S. K. and Uhler, M. D., sixth edition, Lippincott-Raven, 1998.
- MAGOSKI, N. S., SYED, N. I. and BULLOCH, A. G. M., A neuronal network from the mollusc *Lymnaea stagnalis*, *Brain Res.*, 645: 201 – 214, 1994.
- MALYSZ, T., FACCIONI-HEUSER, M.C., PUPERI, C., ACHAVAL, M., ZANCAN, D.M. Identificação de neurônios envolvidos na inervação da região posterior do

- pé do caracol *Megalobulimus oblongus*. XVI Reunião Anual da FESBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.
- MARTIN, W. R., Pharmacology of opioids, *Pharmacol. Rew.*, Vol. 35, N0.4, pp. 285 – 323, 1984.
- MARTINDALE, The complete drug reference, Third-second edition, Pharmaceutical Press, 1999.
- MAXIMOVA, O. A. and BALABAN, P. M., Neuronal correlates of aversive learnig in command neurons for avoidance behavior of *Helix lucorum* L., *Brain Res.*, 292: 139 – 149, 1984.
- McKENZIE, D. J., CAUNCE, M., HETHERINGTON, M. S. and WINLOW, W., Serotonergic innervation of the foot of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.), *J. Neurocytol.*, 27: 459 – 470, 1998.
- McGINTY, J. F. and BLOMM, FLOYD, Double Immunostaining reveals distinctons among opioid peptidergic neurons in the medial basal hypothalamus, *Brain Res.*, **278**: 145 – 153, 1983.
- MCKENNA, O. C. and ROSENBLUTH, J., Myoneural and intermuscular junction in a molluscan smooth muscle, *J. Ultrastructure Research* 42: 434 – 450 (1973).
- METRENEY, D. and BASBAUM, A. I., The distribution of substance P-, enkephalin- and dynorphin-immunoreactive neurons in the medulla of the rat and their contribution to bulbospinal pathways, *Neuroscience*, Vol. 23, N0. 1, pp. 173 – 187, 1987.
- MESTEK, A., HURLEY, J. H., BYE, L. S., CAMPBELL, A. D., CHEN, Y., TIAN, MINGTING, T., LIU, J., SCHULMAN, H. and YU, L., The human μ opioid-receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein-kinase and protein-kinase C, *J. Neurosci.*, 15(3): 2396 – 2406, 1995.
- MEYER, A. R. and CAMPBELL, J. N., Evidence for two distinct classes of unmyelinated nociceptive afferents in monkey, *Brain Res.* , **224**: 149 – 152, 1981.
- MILLAN, M. J., The induction of pain: a n integrative review, *Progress in Neurobiology*, vol. 57, pp. 1 – 164, 1999.
- MOFFETT, S., Locomotion in the pulmonate snail *Melampus*-I. The motor pattern, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 96 A, N0.3, pp. 399 – 406, 1990.
- MONTENEGRO, M. R. e FRANCO, M., Patologia: processos gerais, 4ª edição, Ed. Atheneu, São Paulo, 1999.
- MORIGUCHI-JECKEL, C. M., FACCIONI-HEUSER, M. C., SANTOS, P., BRITTO, C., ZANCAN, D. M., ACHAVAL, M., Ultra-estrutura da região limítrofe entre o

tecido nervoso e a bainha peri-angular no sistema nervoso central do *Megalobulimus oblongus* (Molusco, Gastropoda, Pulmonata), FeSBE – Caxambú –MG, 2001.

- MOROZ, L. L., SUDLOW, L. C., JING, J. and GILLETTE, R., Serotonin-immunoreactivity in peripheral tissues of the opisthobranch molluscs *Pleurobranchaea californica* and *Tritonia diomedea*, *J. Comp. Neurol.*, 382: 176 – 188, 1997.
- MORTON, C. R. and HUTCHISON, W. D., Release of sensory neuropeptides in the spinal cord: studies with calcitonin gene-related peptide and galanin, *Neuroscience*, Vol. 31, N0.3, pp. 807 – 815, 1989.
- NAGY, Z. and SAKHAROV, D. A., The fine structure of the procerebrum of pulmonate molluscs *Helix* and *Limax*, *Tissue & Cell* 2(3): 399 – 411, 1970.
- NIKITIN, V. P. and KOZYREV, S. A., Generalized and signal-specific long-term nociceptive sensitization in the common snail, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 26, N°5, pp. 468 – 476, 1996.
- NIKITIN, V. P. and KOZYREV, S. A., Neuronal mechanisms of site-specific nociceptive sensitization in the common snail, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 29, N°2, pp. 167 – 173, 1999.
- NISBET, R. H., Some aspects of the structure and function of the nervous system of *Archachatina (Calachatina) marginata*, *Proc. Roy. Soc. B.*, 154: 267 – 287, 1961. physiological analysis of peripheral neurones and their possible role in the local reflexes of a mollusc, *J. Exp. Biol.*, 57: 133 – 145, 1972.
- NOBACK, C. R., STROMINGER, N. L. e DEMAREST, R. J., *Neuronatoma: estrutura e função do sistema nervoso humano*, 5ª edição, Ed. Premier, 1999.
- NÓBLEGA, H. G., RIGON, F., FACCIONI-HEUSER, M.C., ACHAVAL, M., Does it exist a hemolymph neural barrier in the nervous central system of *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Gastropoda, Pulmonata)?, *Acta Microscopica V. Press*, 2001.
- O'CALLAGHAN, J. F. and HOLTZMAN, S. G., Quantification of the analgesic activity of narcotic antagonists by a modified hot-plate procedure, *J. Pharmacol. Ther. Exp.*, 192: 497 – 505, 1975.
- OSBORNE, N.N., CUELLO, A. C. and DOCKRAY, G. J., Substance P and cholecystokinin-like peptides in *Helix* neurons and cholecystokinin and serotonin in a giant neuron, *Science*, Vol. 216, 23, pp. 409-411, 1982.
- ORTIZ, T., PIÑERO, J. and COVEÑAS, R., Met-Enkephalin-like immunoreactivity in the nervous system of *Helix aspersa*, *Zoological Science*, 4: 743 – 746, 1987.

- OTTAVIANI, E. and FRANCESCHI, C., The neuroimmunology of stress from invertebrates to man, *Progress in Neurobiology*, Vol. 48, pp. 421 – 440, 1996.
- PANCHIN, Y. V., ZELENIN, P. V. and POPOVA, L. B., Axomized neurons of the pteropod mollusc *Clione limacina* develop novel sites of transmitter release in the absence of their normal muscle target, *Comp. Biochem. Physiol.*, 123 C pp. 185 – 191, 1999.
- PAUWELS, P. J., Diverse signaling by 5-Hydroxytryptamine (5-HT) receptors, *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 60, pp. 1743 – 1750, 2000.
- PEDERSEN, C. A., GAYNES, B. N., GOLDEN, R. N., EVANS, D. L. and HAGGERTY JR., J. J., Neurological aspects of behavior in *Human Behavior: an introduction for medical students*, Stoudemire, A., Third edition, Lippincott-Raven, 1998.
- PERES, T. M., Observações morfológicas do molusco pulmonado *Megalobulimus oblongus*, Trabalho de Conclusão de bacharelado em Ciências Biológicas – UFRGS, 1994.
- PERETZ, B. and ESTES, J., Histology and histochemistry of the peripheral neural plexus in the *Aplysia* gill, *J. Neurobiol.*, Vol. 5, N0.1, pp. 3 –19, 1974.
- PLESCH, B., An ultrastructural study of the innervation of the musculature of the pond snail *Lymnaea stagnalis* (L.) with reference to peripheral neurosecretion, *Cell Tiss. Res.* 183, 353 – 369, 1977.
- RANG, H. P., DALE, M. M. e RITTER, J. M., *Farmacologia*, 3ª edição, Ed. Guanabara-Koogan, 1997.
- RENZELLI-CAIN, R. and KALPUSTIAN, K. V., Evidence for involvement of opioid peptides in phagocytosis, conformation, granulation and aggregation of immunocompetent *Lumbricus terrestris* amoebocytes, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 111C, N0. 2, pp. 205 – 211, 1995.
- ROGERS, D. C., Fine structure of smooth muscle and neuromuscular junctions in the foot of *Helix aspersa*, *Z. Zellforsch*, 99: 315 – 333, 1969.
- ROMERO, S. M. B., HOFFMANN, A. and MENESCAL-DE-OLIVEIRA, L., Is there an opiate in the snail *Megalobulimus sanctipauli* ? Action of morphine and naloxone, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 107C, N°1, pp. 37 – 40, 1994.
- SAKHAROV, D., NEZLIN, L., MOROZ, L. and ELOFSSON, R., Patterns of enkephalin immunolabeling in the pulmonate snail *Cepaea nemoralis* and related molluscs, *Brain Res.*, **620**: 114 – 121, 1993.
- SALZET, M. and STEFANO, G. B., Invertebrate proenkephalin: δ opioid binding sites in leech ganglia and immunocytes, *Brain Res.*, **768**: 224 – 232, 1997.

- SANDERS-BUSH, E. and MAYER, S. E., 5-Hydroxytryptamine (serotonin): receptor agonists and antagonists in *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Hardman, J. G., Limbird, L. E. and Gilman, A. G., Tenth edition, McGraw-Hill, 2001.
- SANTOS, P., FACCIÓNI-HEUSER, M. C., ZANCAN, D. M., GEHLEN, G., ACHAVAL, M., Análise imuno-histoquímica dos filamentos intermediários de células gliais no SNC do caracol *Megalobulimus oblongus*, XV Reunião Anual da FeSBE, Caxambú (MG), agosto de 2000.
- SANTOS, P., FACCIÓNI-HEUSER, M. C., GEHLEN, G., ACHAVAL, M., Filamentos intermediários de células gliais de *Megalobulimus oblongus*: análise imuno-histoquímica a nível eletrônico, XVI Reunião Anual da FeSBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.
- SASAKI, M., ISHIZAKI, K., OBATA, H. and GOTO, F., Effects of 5-HT₂ and 5-HT₃ receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test, *Eur. J. Pharmacol.*, 424: 45-52, 2001.
- SATTERLIE, R. A., Serotonin modulation of swimming speed in the pteropod mollusc *Clione limacina* in *Molluscan Neurobiology*, Kits, K., S., Boer, H. H. and Joose, J., Amsterdam, 1991.
- SATYABRATA, K., GIBSON, S. J., SCARAVILLI, F., JACOBS, J. M., ABER, V. R. and POLAK, J. M., Reduced numbers of calcitonin gene-related peptide-(CGRP-) and tachykinin-immunoreactive sensory neurones associated with greater enkephalin immunoreactivity in the dorsal horn of a mutant rat with hereditary sensory neuropathy, *Cell Tissue Res.*, 255: 451 – 466, 1989.
- SAWAYA, P., PETERSEN, J. A., Sobre a ocorrência de *Strophocheillidae* (Molusco, Gastrópodo) no Rio Grande do Sul, *Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. S. Paulo*, 261: 31 –42, 1962.
- SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., PETROVICK, P. R., Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos in *Farmacognosia, da planta ao medicamento*, 2ª edição, SIMÕES et al., Editora da Universidade (UFRGS, UFSC), 1999.
- SCHOT, L. P. C., BOER, H. H., SWAAB, D. F. and VAN NOORDEN, S., Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central nervous system of the pond snail *Lymnea stagnalis* with antisera raised to biologically active peptides of vertebrates, *Cell Tissue Res.*, 216: 273 – 291, 1981.
- SCHULMAN, H. and HYMAN, S. E., Intracellular signaling in *Fundamental Neuroscience*, Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L. and Squire, L. R., Academic Press, 1999.

- SHEVELKIN, A. V., NIKITIN, V. P., KOZYREV, S. A., SAMOILOV, M. O. and SHERSTNEV, V. V., Serotonin imitates several of the neuronal effects of nociceptive sensitization in the common snail, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 28, N°5, pp. 547 – 555, 1998.
- SHIBATA, M., OHKUBO, T., TAKAHASHI, H. and INOKI, R., Modified formalin test: characteristic biphasic pain response, *Pain*, 38: 347 – 352, 1989.
- SOJA, P. J. and SINCLAIR, J. G., Evidence against a serotonin involvement in the tonic descending inhibition of nociceptor-driven neurons in the cat spinal cord, *Brain Res.*, 199: 225 – 230, 1980.
- SONETTI, D., OTTAVIANI and STEFANO, G. B., Opiate signaling regulates microglia activities in the invertebrate nervous system, *Gen. Pharmacol.*, Vol. 29, N0. 1 pp. 39 – 47, 1997.
- STEFANO, G. B., VADASZ, I. and HIRIPI, L., Methonine-enkephalin inhibits the bursting activity of the BR-type neuron in *Helix pomatia* L., *Experientia*, 36: 666 – 667, 1980.
- STEFANO, G. B., ZUKIN, R. S. and KREAM, R. M., Evidence for the presynaptic localization of a high affinity opiate binding site on dopamine neurons in the pedal ganglia of *Mytilus edulis* (Bivalva), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Vol. 222 N° 3, pp. 759 – 764, 1982.
- STEFANO, G. B., LEUNG, M. K., ZHANG, X. and SCHAMER, B., Evidence for the involvement of opioid neuropeptides in the adherence and migration of immunocompetent invertebrate hemocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 86, pp. 626 – 630, jan. 1989.
- STEIN, C., The control of pain in the peripheral tissue by opioids, *N. Engl. J. Med.*, Vol. 332, N0.23, pp. 1685 – 1690, 1995.
- STEVENS, C. W., Alternatives to the use of mammals for pain research, *Life Sci.*, Vol. 50, N°13, pp. 901 – 912, 1992.
- STEWART, H. C. H., HSIAO, S. and BUSHNELL, M. C., Somatic sensation, in *Fundamental Neuroscience*, Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L. and Squire, L. R., Academic Press, 1999.
- SONETTI, D., OTTAVIANI, E. and STEFANO, G. B., Opiate signaling regulates microglia activities in the invertebrate nervous system, *Gen. Pharmac.*, vol. 29, N°1, pp. 39 – 47, 1997.
- SUSSWEIN, A. J. and LEVY, M., Separate neural pathways respond to different noxious stimuli affecting respiratory pump frequency in *Aplysia fasciata*, *Brain Res.*, 616: 218 – 229, 1993.

- THADDEU, R. C., Farmacologia do sistema nervoso central *in Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional*, Fuchs, F. D. e Wannamacher, L., 2^a edição, Ed. Guanabara-Koogan, 1998.
- TAIWO, Y. O., FABIAN, A., PAZOLES, C. J. and FIELDS, H. L., Potentiation of morphine antinociception by monoamine reuptake inhibitors in the rat spinal cord, *Pain*, 21: 329 – 337, 1983.
- TIERNEY, A. J., Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review , *Comp. Biochem. Physiol.* , Part A **128**: 791 – 804, 2001.
- TRAUB, R. J., The spinal contribution of the induction of central sensitization, *Brain Res.*, 778: 34-42, 1997.
- VEENSTRA-VANDERLEWEELE, J., ANDERSON, G. M., COOK, E. H. Jr., Pharmacogenetics and the system: initial studies and future directions, *Eur. J. Pharmacol.*, Vol. 410, pp. 165 – 181, 2000.
- WALCOURT-AMBAKEDEREMO, A. and WINLOW, W., 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurones in culture: pharmacological characterization of 5-HT₂ receptors, *Gen. Pharmacol.*, Vol. 25, N^o6, pp. 1079 – 1092, 1994.
- WANNAMACHER, L. e FERREIRA, M. B. C., Farmacologia clínica da dor *in Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional*, Fuchs, F. D. e Wannamacher, L., 2^a edição, Ed. Guanabara-Koogan, 1998.
- WARIZI, R., Morphine effects on cholinergic synaptic transmission in *Aplysia*: evidence for receptor blockade, *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 55C, pp. 95 – 102, 1976.
- WIETERLAK, E. P., SMITH, K. P., FURNESS, L., MOONEY-HEIBERGER, K., MAYR, T., MAIER, S. F. and WATKINS, L. R., Acute and conditioned hyperalgesic responses to illness, *Pain*, 56: 227 – 234, 1994c.
- WOOLFE, G. and MACDONALD, A. O., The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 120: 52 – 57, 1944.
- WRIGHT, W. G. and CAREW, T. J., A single identified interneuron gates tail-shock induced inhibition in the siphon withdrawal reflex of *Aplysia*, *J. Neurosci.*, 15(1): 790 – 797, 1995.
- ZANCAN, D. M. e ACHAVAL, M., Morphology of the dorsal body and its seasonal variations of the *Megalobulimus oblongus* (Mollusca, Pulmonata), *Revista Brasileira de Biologia*, Vol. 55, n^o1 págs.1 – 11, 1995.

- ZANCAN, D. M., BRAUER, M. and ACHAVAL, M., Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata), *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 118 A, N°3, pp. 765 – 772, 1997.
- ZANCAN, D.M., DAL PIVA, M.M., FIORENTINI, M.R., SCHWEIGER, C., PUPERI, C., LOPES, C.Q., ACHAVAL, M., FACCIONI-HEUSER, M.C. Estrutura dos palpos labiais do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus* (GASTROPODA, PULMONATA). XVI Reunião Anual da FESBE, Caxambú (MG), agosto de 2001.
- ZHU, W., BAGGERMAN, G., GOUMON, Y., CASARES, F., BROWNAWELL, B. and STEFANO, G. B., Presence of morphine and morphine-6-glucoronide in the marine mollusk *Mytilus edulis* ganglia determined by GC/MS and Q-TOF-MS starvation increases opiate alkaloid levels, *Mol. Brain Res.*, 88: 155 – 160, 2001.