

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

**IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS APÓS ESTIMULAÇÃO PERIFÉRICA  
NOCIVA E TRATAMENTO COM MORFINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL  
DO CARACOL TERRESTRE *Megalobulimus abbreviatus***

Dissertação de Mestrado

Paula Rigon da Luz Soster

Porto Alegre, 2005.

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

**IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA C-FOS APÓS ESTIMULAÇÃO PERIFÉRICA  
NOCIVA E TRATAMENTO COM MORFINA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL  
DO CARACOL TERRESTRE *Megalobulimus abbreviatus***

Paula Rigon da Luz Soster

Orientadora  
Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

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

Porto Alegre, 2005.

***“O que eu penso a respeito da vida, é que um dia ela vai perguntar o que é que eu fiz com meus sonhos, e qual foi o meu jeito de amar, o que é que eu deixei para as pessoas, que no mundo vão continuar, para que eu não tenha vivido à toa, e que não seja tarde demais”.***

*(J. Trevisol)*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Matilde, pelo constante incentivo durante muitos anos de afastamento, sempre acreditando em minha capacidade e me trazendo “de volta meu antigo sonho”. Pela competência com me orientou e pelo forte elo de amizade que estabelecemos, meu profundo agradecimento.

À Professora Denise Maria Zancan, pelos conhecimentos transmitidos, pela grande disponibilidade em me ajudar sempre que foi preciso e pela “divisão” dos caracóis ao longo destes anos.

À Professora Maria Cristina Faccioni-Heuser, a Cris, por ter sempre uma palavra amiga quando estamos “levemente apavorados”.

À Professora Wânia Partata, pelas dúvidas divididas e pela ajuda na busca de respostas neste estudo da c-Fos.

Ao Léder, pelos madrugadões de trabalho na densitometria e análise estatística.

Ao pessoal do “jogo do bingo da densitometria”, minhas bolsistas e amigas Laura e Cynthia, pela inestimável ajuda desde a realização da imunoistoquímica até a finalização desta dissertação. Vocês foram ótimas!

Ao pessoal do Laboratório: Juliana, Günther, Rafaela, Taís, Marina, Pedro, Régis e Gisele, pela disponibilidade em sempre oferecer ajuda e agüentarem o estresse de final de mestrado.

À amiga Flávia, por compartilharmos as angústias e o analisador de imagens nesta nossa reta final.

Aos amigos de sempre Bebel, Simone e Jocemar, por estarem sempre próximos quando mais precisei.

Às colegas que não estão mais no Lab, mas que foram muito importantes no início desta caminhada: Aline, Alessandra e Cláudia Puperi.

À Nice, uma “nova amiga”, colega, companheira e grande incentivadora, sempre destacando minhas qualidades e me ajudando a buscar cada vez mais.

À Erica, uma “velha amiga”, que sempre esteve junto a mim e foi extremamente disponível na ajuda da finalização deste trabalho. Te devo muito pela montagem das figuras!

À minha família, pela compreensão nos momentos em que não pude estar junto deles na realização desta tarefa.

À minha amada mãe, pelo apoio incondicional e principalmente por me permitir ser quem eu sou. A tua dedicação torna minha vida melhor.

Ao meu marido Giovani, pelo incentivo, carinho e companheirismo em todos os momentos e por me ensinar o significado do amor.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, por me transmitirem o conhecimento que tenho hoje.

À Eudira da Luz, técnica deste laboratório, pelo suporte técnico, chazinho, coca-cola light, pipoca...

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Morfológicas desta universidade, pela oportunidade que me deram de serem meus colegas. E aos meus alunos, principalmente do Curso de Medicina, por me confirmarem a cada dia a certeza que já tenho de “como é bom ser professora.”

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas	viii
Lista de figuras e tabelas	x
Resumo	xiv
1 – Introdução	1
1.1 - Dor e nocicepção em invertebrados	1
1.2 – Circuito neurais e nocicepção em invertebrados	9
1.3 – Modulação da resposta nociceptiva em invertebrados	15
1.4 – Regulação da expressão gênica por estímulos exógenos: a ação dos proto-oncogenes	18
1.5 – Sistema nervoso central de <i>M. abbreviatus</i>	27
1.6 – Mediadores químicos no SNC de <i>M. abbreviatus</i>	29
2 – Objetivos	39
3 – Material e métodos	41
3.1 – Animais de experimentação	41
3.2 – Procedimentos experimentais	43
3.2.1 – Experimento 1	43
3.2.2 – Experimento 2: Tratamento com morfina	44
3.3 – Obtenção do sistema nervoso central	45
3.4 – Fixação	46
3.5 – Secções histológicas	47
3.6 – Imunoistoquímica	47
3.6.1 – Tratamento prévio à incubação com o primeiro anticorpo	47
3.6.2 – Aplicação do primeiro anticorpo	48
3.6.3 – Aplicação do segundo anticorpo	49
3.6.4 – Aplicação do terceiro anticorpo ou complexo PAP	49
3.6.5 – Revelação da reação peroxidase	50
3.6.6 – Montagem dos cortes	50
3.6.7 – Controle da especificidade da reação	50
3.7 – Densidade óptica	51
3.8 – Análise estatística	53

4 – Resultados	54
4.1 – Estímulo térmico aversivo	54
4.2 – Imunorreatividade à proteína c-Fos	55
4.2.1 – Grupo controle	60
4.2.1.1 – Gânglios cerebrais	60
4.2.1.2 – Complexo subesofageano	61
4.2.2 – Grupo 3h após o estímulo térmico aversivo	74
4.2.2.1 – Gânglio cerebrais	74
4.2.2.2 – Complexo subesofageano	75
4.2.3 - Grupo 6h após o estímulo térmico aversivo	81
4.2.3.1 – Gânglios cerebrais	81
4.2.3.2 – Complexo subesofageano	81
4.2.4 - Grupo 12h após o estímulo térmico aversivo	87
4.2.4.1 – Gânglios cerebrais	87
4.2.4.2 – Complexo subesofageano	87
4.2.5 - Grupo 18h após o estímulo térmico aversivo	92
4.2.5.1 – Gânglios cerebrais	92
4.2.5.2 – Complexo subesofageano	92
4.2.6 - Grupo 24h após o estímulo térmico aversivo	97
4.2.6.1 – Gânglios cerebrais	97
4.2.6.2 – Complexo subesofageano	97
4.3 – Tratamento com morfina	101
4.4 - Densidade óptica	104
5 – Discussão	115
6 – Conclusões	134
7 – Perspectivas	135
8 – Referências bibliográficas	137

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AG – ácido glioxílico

AOI – área de interesse

CaMK – proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina

Complexo CP – complexo cabeça-pé

CRE – elemento de resposta ao  $Ca^{2+}$ /AMPc

DAB - diaminobenzidina

DAG – diacilglicerol

FMRFamida-ir – imunorreativo à FMRFamida

Fos-ir – imunorreativo à c-Fos

LTP- potenciação de longa duração

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

MEnK – metionina encefalina

MEnK-ir – imunorreativo à metionina encefalina

PAP – complexo peroxidase anti-peroxidase

PBS – tampão fosfato salino

PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

POMC – pró-opiomelanocortina

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

SER – elemento de resposta ao soro

SIE – elemento sis-induzível

SN – sistema nervoso

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

SP – substância P

SP-ir – imunorreativo à substância P

TF – tampão fosfato

TGF- $\beta$  - fator  $\beta$  de transformação de crescimento

5-HT – serotonina

5-HT-ir – imunorreativo à serotonina

5,7-DHT – 5,7 diidroxitriptamina

**LISTA DE FIGURAS E TABELAS**

Figura 1	Representação esquemática do comportamento aversivo de <i>M. abbreviatus</i>	8
Figura 2	Representação esquemática do circuito de retirada proposto para <i>Helix lucorum</i>	10
Figura 3	Representação esquemática da morfologia e localização dos neurônios modulatórios e comando em <i>Helix lucorum</i>	11
Figura 4	Neurônios Pd4 de <i>M. abbreviatus</i>	12
Figura 5	Esquema do circuito neural que controla os reflexos de retirada do sifão e das brânquias em <i>Aplysia</i>	14
Tabela 1	Características dos fatores de transcrição da família Fos	20
Figura 6	Papel da c-Fos e c-Jun na transdução do sinal nuclear	21
Figura 7	Representação esquemática da região regulatória do gene c-fos	22
Figura 8	Representação esquemática do sistema nervoso central de <i>M. abbreviatus</i>	28
Figura 9	Representação esquemática do complexo subesofageano e dos gânglios cerebrais de <i>M. abbreviatus</i>	29
Figura 10	Caracol da espécie <i>Megalobulimus abbreviatus</i>	41
Figura 11	Caracterização do animal adulto	42
Figura 12	Modelo de aplicação do estímulo térmico aversivo	43
Figura 13	Representação esquemática de localização da AOI no SNC de <i>M. abbreviatus</i>	52
Figura 14	Gráfico da resposta latência	57
Figura 15	Localização e intensidade da imunorreação	58
Figura 16	Especificidade da imunorreação	59
Figura 17	Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir no SNC de animais do grupo controle	63

Figura 18	Imunorreatividade de neurônios no gânglio cerebral em corte medial de animais do grupo controle	64
Figura 19	Imunorreatividade de neurônios no gânglio cerebral em corte dorsal de animais do grupo controle	65
Figura 20	Detalhe de neurônios Fos-ir do pró-cérebro e do lobo pedal do pós-cérebro de animais do grupo controle	66
Figura 21	Detalhe do lobo pleural do pós-cérebro de animais do grupo controle	67
Figura 22	Localização dos grupos neuronais analisados nos gânglios pedais	68
Figura 23	Secção ventral do gânglio pedal de animais do grupo controle	69
Figura 24	Detalhe de neurônios laterais do gânglio pedal de animais do grupo controle	70
Figura 25	Detalhe de neurônio gigante da região posterior do gânglio pedal	71
Figura 26	Gânglio parietal direito com neurônios Fos-ir e regiões analisadas	72
Figura 27	Secção dos gânglios parietal direito e visceral de animais do grupo controle	73
Figura 28	Representação esquemática da distribuição de neurônios Fos-ir no SNC de animais do grupo 3h	76
Figura 29	Detalhe do lobo pleura do pós-cérebro de animais do grupo 3h	77
Figura 30	Detalhe da região posterior do gânglio pedal de animais do grupo 3h	78
Figura 31	Secção ventral dos gânglios pedais com detalhe de neurônios grandes em animais do grupo 3h	79
Figura 32	Detalhe da região posterior do gânglio parietal direito de animais do grupo 3h	80
Figura 33	Representação esquemática da distribuição de neurônios Fos-ir no SNC de animais do grupo 6h	83
Figura 34	Neurônios Fos-ir nos gânglios cerebrais de animais do grupo 6h	84
Figura 35	Detalhe de neurônios posteriores dos gânglios pedais de animais do grupo 6h	85
Figura 36	Neurônios Fos-ir nos gânglios parietal direito e visceral de animais do grupo 6h	86

Figura 37	Representação esquemática da distribuição de neurônios Fos-ir no SNC de animais do grupo 12h	89
Figura 38	Imunorreatividade do neurônio Pd4 de animais sacrificados em diferentes tempos	90
Figura 39	Neurônios Fos-ir nos gânglios parietal direito e visceral de animais do grupo 12h	91
Figura 40	Representação esquemática da distribuição de neurônios Fos-ir no SNC de animais do grupo 18h	94
Figura 41	Detalhe do lobo pleural do pós-cérebro de animais do grupo 18h	95
Figura 42	Neurônios Fos-ir nos gânglio parietal direito e visceral de animais do grupo 18h	96
Figura 43	Representação esquemática da distribuição de neurônios Fos-ir no SNC de animais do grupo 24h	99
Figura 44	Detalhe do mesocérebro de animais do grupo 24h	100
Figura 45	Detalhe do mesocérebro de animais tratados com morfina	102
Figura 46	Comparação da imunorreatividade de animais controle e tratados com morfina	103
Figura 47	Gráfico da densidade óptica dos gânglios cerebrais	107
Figura 48	Gráfico da densidade óptica dos gânglios pedais	108
Figura 49	Gráfico da densidade óptica do gânglio parietal direito	109
Figura 50	Gráfico da densidade óptica do gânglio visceral	110
Figura 51	Gráfico da densidade óptica das regiões dos gânglios cerebrais de animais tratados com salina ou morfina	111
Figura 52	Gráfico da densidade óptica das regiões dos gânglios pedais de animais tratados com salina ou morfina	112
Figura 53	Gráfico da densidade óptica das regiões do gânglio parietal direito de animais tratados com salina ou morfina	113
Figura 54	Gráfico da densidade óptica do gânglio visceral de animais tratados com salina ou morfina	114
Figura 55	Representação esquemática da distribuição de neurônios Fos-ir no SNC de <i>M. abbreviatus</i>	124

- Figura 56 Comparação da imunorreatividade de neurônios laterais dos 126 gânglios pedais de animais controle e tratados com morfina
- Figura 57 Comparação da quantidade de neurônios Fos-it nos gânglios 132 pedais de animais controle e submetidos ao estímulo térmico aversivo

## RESUMO

Utilizando as técnicas de imunistoquímica e densitometria óptica, foi investigada a localização e a expressão da proteína c-Fos no SNC do caracol *Megalobulimus abbreviatus*. Neurônios imunorreativos foram encontrados nos gânglios cerebrais, pedais, parietal direito e visceral de caracóis submetidos ao estímulo térmico aversivo (50°C), e sacrificados em diferentes tempos (3, 6, 12, 18 e 24 h) após a estimulação. A análise da imunorreatividade à c-Fos através do método de medida da densidade óptica (DO) revelou uma diferença significativa no sentido de apresentar uma maior expressão ( $p < 0,05$ ) na área do lobo pedal do pós-cérebro do gânglio cerebral em relação às outras regiões analisadas no mesmo gânglio (mesocérebro, pró-cérebro e lobo pleural do pós-cérebro). Além disso, também houve expressão significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada a densitometria da região do mesocérebro em relação ao lobo pleural do pós-cérebro nos grupos controle, 3h e 18h. O lobo pleural do pós-cérebro apresentou uma expressão significativamente menor ( $p < 0,05$ ) na imunorreatividade da proteína c-Fos quando comparado ao pró-cérebro em animais sacrificados 12h e 24h após e estímulo aversivo. Em relação ao grupo controle, a DO da proteína c-Fos não variou nos diferentes tempos de sacrifício quando comparada a mesma região do gânglio (cerebral, pedal, parietal direito ou visceral) ao longo do tempo na maioria das regiões. A única diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada no mesocérebro do gânglio de animais sacrificados 12 h após o estímulo térmico aversivo, mostrando uma diminuição da imunorreatividade.

Nos animais tratados com salina (1ml) ou morfina (20mg/kg) 15 min antes do estímulo térmico aversivo, os mesmos grupos neuronais nos gânglios do SNC de *M. abbreviatus* mostraram imunomarcção à proteína c-Fos. Em relação ao grupo

controle, observou-se uma expressão significativamente menor ( $p < 0,01$ ) na DO da imunorreatividade da proteína c-Fos nos neurônios anteriores do gânglio pedal nos animais sacrificados 3 h e 6 h após o estímulo térmico aversivo. No momento em que a comparação foi feita entre os grupos salina e morfina de animais sacrificados ao mesmo tempo, na grande maioria dos grupos observou-se uma diminuição na imunorreatividade da proteína c-Fos. Esta diferença, porém, mostrou-se significativa ( $p < 0,01$ ) no mesocérebro de animais do grupo 3h, no lobo pedal do pós cérebro de animais dos grupos 3 h, 6 h e 18 h, nos neurônios anteriores do gânglio pedal nos grupos 6 h e 12 h, nos neurônios mediais do gânglio pedal do grupo 3 h, nos neurônios posteriores do gânglio pedal do grupo 6 h, nos neurônios da região anterior do gânglio parietal direito no grupo 12 h e nos neurônios do gânglio visceral no grupo experimental 12 h. A diferença na DO da proteína c-Fos apresentou uma diminuição extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) nos neurônios mediais do gânglio pedal de animais sacrificados 12 h após o estímulo térmico aversivo, nos neurônios posteriores do gânglio pedal dos animais sacrificados 12 h após o estímulo e nos neurônios do gânglio visceral dos animais do grupo experimental 6 h.

A partir destes dados e da correlação com estudos realizados em *M. abbreviatus* para detecção de mediadores químicos envolvidos na nocicepção, podemos concluir que as áreas imunorreativas que apresentaram estas variações na densidade óptica da imunorreatividade à proteína c-Fos em diferentes tempos de sacrifício e tratamento com morfina estão envolvidas no processo nociceptivo neste caracol.

**Palavras-chave:** nocicepção, c-Fos, densidade óptica, imunoistoquímica, caracol, estímulo térmico, morfina.

## **1 - INTRODUÇÃO**

### **1.1- DOR E NOCICEPÇÃO EM INVERTEBRADOS**

A nocicepção é uma sensação produzida por injúrias ou estímulos com intensidade suficiente para serem potencialmente lesivos, provocando uma série de comportamentos protetores dos tecidos lesados, como reflexos de retirada, fuga ou imobilização da zona danificada, compondo uma função importante do sistema sensorial nociceptivo, que é a prevenção da lesão e dos agentes que a provocam (ACHAVAL, 1991). A expressão de respostas nociceptivas é determinada pela anatomia, morfologia, fisiologia neural, além da modulação por vários fatores biológicos endógenos e exógenos (KAVALIERS, 1988a; BALABAN, 2002).

A habilidade de responder a estímulos aversivos do meio é uma característica básica dos animais. Este comportamento adaptativo implica na presença de nociceptores e de efetores que respondem às aferências sensoriais com comportamentos reflexos ou não reflexos. Os nociceptores podem ser preferencialmente sensíveis a um estímulo nocivo, podendo codificar a sua intensidade. Além disso, as respostas dos efetores devem ser apropriadas à informação dos receptores e a capacidade de resposta central e/ou periférica deve também estar presente. Assim, a nocicepção e o conceito relacionado de estimulação nociva, é definida mais pela natureza da resposta do que pela natureza física do estímulo (KAVALIERS, 1988a; CHASE, 2002).

Comportamentos nociceptivos em um organismo podem ser considerados como aqueles associados com a apreciação da transmissão do estímulo “doloroso” e aversivo. Já a dor é uma experiência perceptual complexa que é essencial para a existência do organismo. A percepção da dor age como um sistema de aviso, alertando o indivíduo à possíveis danos corporais (SANBERG et al., 1988). Dor em humanos é definida pela Associação Internacional de Estudo da Dor como : “uma experiência desagradável sensorial e emocional associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano”. Esta definição foi ampliada ao incluir a expressão de “comportamentos de dor”, os quais podem variar de comportamentos visíveis ou audíveis a comportamentos aversivos e/ou modificações comportamentais aprendidas. A dor em animais não humanos tem sido definida como: “uma experiência sensorial aversiva causada por uma injúria potencial ou real que provoca reações vegetativas e motoras protetoras, resultando em aversão aprendida e pode modificar comportamentos específicos da espécie, incluindo comportamento social (KAVALIERS, 1988a).

Considerada como um fato objetivo, a dor corresponde à atividade de nociceptores como uma consequência de estimulações nocivas. As qualidades emocionais desagradáveis envolvidas nas sensações de dor e forte motivação de remover a fonte da estimulação nociva geralmente parecem compreender a experiência amplamente conhecida como sofrimento. A ocorrência do sofrimento em animais é freqüentemente inferida de mudanças comportamentais e fisiológicas tais como reflexos flexores, aumento da pressão sangüínea ou vocalizações, todas elas sendo concomitantes de dor severa em humanos. A sugestão de que os animais podem sofrer por certas estimulações implica na inferência da existência de uma analogia neural com o sofrimento de sensações de dor em humanos. Entretanto, a

idéia de um “senso de dor” em animais parece progressivamente menos defensível quando se considera animais filogeneticamente distantes de humanos (FIORITO, 1986).

É difícil para o observador humano interpretar o comportamento animal de forma completa e objetiva. Descrições de posturas, movimentos e vocalizações que estão associados com a nocicepção podem ser objetivas e quantificáveis, mas a interpretação destes comportamentos está fortemente associada a conotações da experiência humana, e muitas pesquisas em animais de laboratório têm considerado explícita e implicitamente “nocicepção” e “dor” como equivalentes (SANBERG et al., 1988; KAVALIERS, 1988a). Entretanto, a atividade induzida em nociceptores e em vias nociceptivas por estímulos nocivos não deve necessariamente ser sempre considerada como indicativo de dor.

Não é correto assumir que todos os animais devem ter sentimentos conscientes e sofrimento comparáveis aos humanos tanto em grau quanto em tipo, mas se deve reconhecer que muitos animais têm algum nível de “sentimento” e “consciência”, “expectativa” e “efeito”, e que existe uma marcada graduação e especialização entre estes níveis entre os taxons animais, desde os mais “simples” aos mais “avançados”. Os moluscos estão incluídos no filo “avançado” de invertebrados, juntamente com os anelídeos, artrópodes e equinodermos, desenvolvendo comportamentos e respostas a fatores biológicos e físicos relativamente mais sofisticados do que o filo “simples” de invertebrados (poríferos, cnidários e platelmintos). Estas capacidades corporais e os níveis de discriminação ambiental são compatíveis com o desenvolvimento e a expressão de comportamentos defensivos e respostas nociceptivas mais diversificados (KAVALIERS, 1988a).

A maioria, senão todos os invertebrados tem a capacidade de detectar e responder a estímulos nocivos ou aversivos, exibindo respostas nociceptivas análogas àsquelas mostradas por vertebrados (SMITH, 1991). Além disso, a hipótese de que os invertebrados sentem dor pode ser suportada pela analogia entre a nocicepção como ela é conhecida em humanos e como ela é sugerida em vertebrados superiores. Analogias neurais são, entretanto, uma condição necessária, mas insuficiente para inferir que os animais sofrem. Assim, para contar com os invertebrados como um padrão de referência para se basear na estrutura e função do sistema nervoso destes animais, parece fundamental procurar indicadores comportamentais de experiência de dor. Embora não exista prova conclusiva de que um invertebrado possa experimentar algo parecido com a dor humana, análises experimentais de exemplos conhecidos de comportamentos e fisiologia de invertebrados podem facilitar uma decisão racional (FIORITO, 1986).

O sistema nervoso (SN) mais sofisticado dos invertebrados é encontrado no filo dos Moluscos, sendo que o maior grau de desenvolvimento do SN aparece nos cefalópodes, tal como *Octopus vulgaris*, onde se têm referido a presença de vias ou tratos de “dor” em seu sistema nervoso central. Embora outras classes de moluscos apresentem o SN menos complexo do que o dos cefalópodes, eles também são capazes de desenvolver o que pode ser chamado de respostas nociceptivas (KAVALIERS, 1988a).

Um processo doloroso pode resultar de uma estimulação interna ou externa; o sentimento ou a percepção de dor pode produzir uma reação para minimizar o estímulo, onde o animal retira ou neutraliza o agente causador, e age para proteger partes feridas de injúrias adicionais. Muitos tipos de respostas estão envolvidas

neste processo, incluindo retirada, agressão, aversão aprendida ou agressão aprendida (FIORITO, 1986).

Exemplos adicionais do paralelo entre as respostas nociceptivas de mamíferos e moluscos são providas pelo gastrópodo *Aplysia californica*, que responde à estimulação nociva mecânica ou elétrica na superfície do corpo com um conjunto de respostas nociceptivas que incluem retirada local do corpo e liberação de muco, retirada das brânquias e do sifão, liberação de tinta e opalina, locomoção de fuga e comportamento respiratório elevado (WALTERS & ERICKSON, 1986; KAVALIERS, 1988a).

Um estímulo térmico a temperaturas elevadas é considerado nocivo para o caracol *Megalobulimus abbreviatus* (ACHAVAL et al., 2005), gerando comportamentos defensivos, semelhante ao comportamento aversivo após estímulo térmico em caracóis, tais como, *Cepaea nemoralis*, *Megalobulimus sanctipauli* e *Aplysia californica* (KAVALIERS et al., 1983; WALTERS et al., 1987; KAVALIERS, 1988a; ROMERO et al., 1994). No comportamento aversivo, os caracóis apresentam uma reação de retirada acompanhada de secreção mucosa. *Megalobulimus abbreviatus*, após colocado em uma placa quente (22°C), somente apresenta um comportamento exploratório, ficando o complexo cabeça-pé (CP) estendido, tocando o substrato e mostrando movimentos ondulatórios lentos da região parapodial. Na região anterior do complexo CP do caracol, o parapódio mostra uma elevação. Os palpos labiais e tentáculos orais estão em constante movimento e quando tocam o substrato apresentam uma rápida retração, mostrando novamente uma imediata palpação tentacular do substrato, explorando o ambiente. O caracol mostra uma pequena elevação da região da cabeça, e então realiza movimentos de virada do corpo, sem rotação da concha e sem atividade locomotora. Não se observa

nenhuma alteração na produção de muco ou na coloração do mesmo (ACHAVAL et al., 2005).

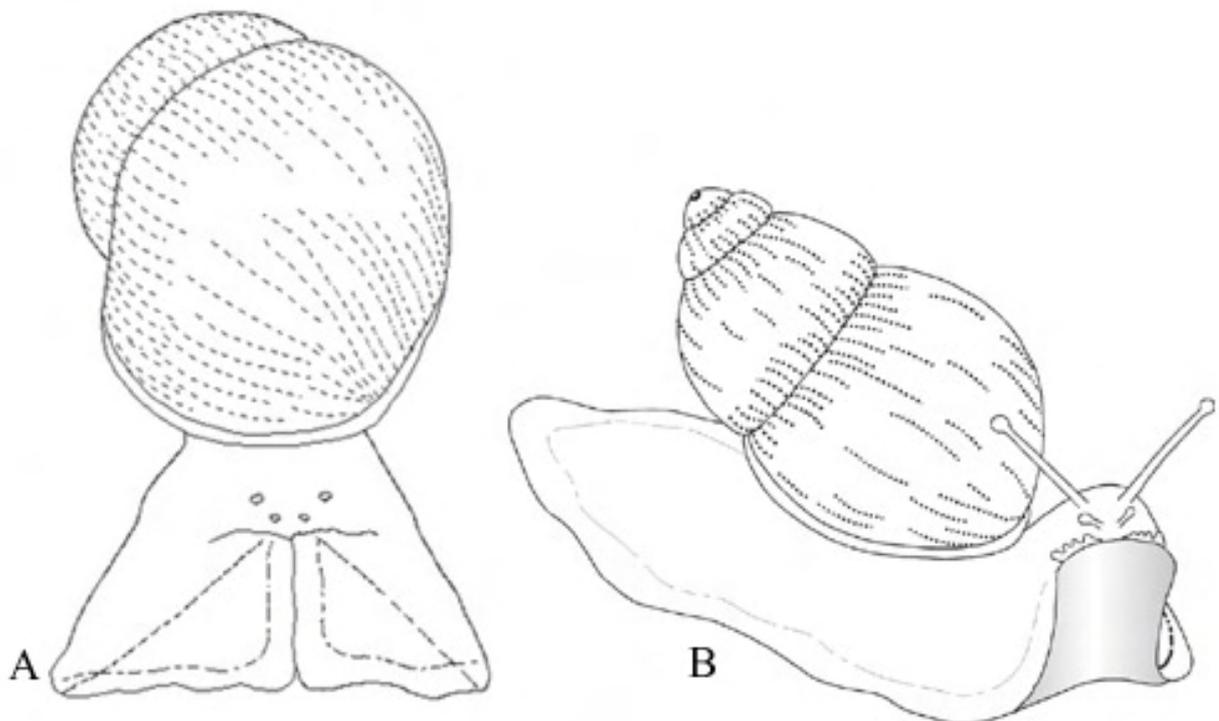
Quando submetido a um estímulo térmico de 50°C, o *M. abbreviatus* apresenta um comportamento aversivo bifásico, exibindo na primeira fase uma retração do corpo para dentro da concha e na segunda fase protração e movimentos de procura (ACHAVAL et al., 2005), semelhante ao descrito em *Cepaea nemoralis* (DYAKONOVA et al., 1995). Após colocado na placa quente, o caracol inicia a primeira fase do comportamento aversivo, exibindo uma distensão do pé, o qual imediatamente se eleva nas porções laterais. Ao mesmo tempo, os tentáculos orais e os palpos labiais retraem-se, o que é seguido de uma retração medial-ventral do complexo CP, iniciando-se na região rostral e estendendo-se para a região caudal. Assim, apenas a porção lateral do pé permanece tocando o substrato, exibindo uma parcial retração do corpo para dentro da concha. Quando observado de frente, o complexo CP mostra um aspecto triangular (Fig. 1-A). Em uma segunda fase, os tentáculos orais e palpos labiais começam a protrair-se e o caracol desenvolve movimentos de procura, seguidos por ondas parapodiais laterais, caracterizando um movimento exploratório. Em seguida o animal exibe uma elevação do complexo CP a 1 cm ou mais do substrato (Fig. 1-B), caracterizando o comportamento aversivo (ACHAVAL et al., 2005).

Os moluscos liberam uma secreção mucosa na superfície do corpo, composta principalmente de água, que contém mucopolissacarídeos ácidos fosfatados, proteínas e substâncias exógenas derivadas da hemolinfa. Esta secreção é proveniente de glândulas que secretam continuamente para proteger a pele. A principal função desta secreção nos moluscos aquáticos é diluir e lavar substâncias irritantes, porém, também exerce importante função como mecanismo

de defesa. No entanto, os pulmonados terrestres necessitam de uma secreção mucosa para realizarem sua locomoção, além de ser uma estrutura protetora à perda de água em ambientes quentes e secos, é importante na alimentação e no processo reprodutivo destes animais. Quando relacionado à locomoção, o muco apresenta propriedades adesivas importantes. Ele é secretado sob o pé principalmente por uma pequena glândula localizada ao longo da linha média na metade anterior do corpo, denominada glândula suprapediosa. Os caracóis terrestres e lesmas exibem uma série de comportamentos que parecem estar adaptados à conservação de água, o que permite a certas espécies viver em ambientes quentes e secos, embora geralmente os caracóis terrestres pulmonados sejam encontrados apenas em habitats úmidos (CHASE, 2002). Os pulmonados com conchas reagem para impedir a dessecação fixando-se a troncos de árvores, pedras e paredes e secretando um fino filme de muco, denominado epifragma, na abertura da concha. Sobre este epifragma é depositada uma fina cobertura calcárea, fazendo com que o caracol se feche dentro de uma estrutura impermeável à água, na qual eles podem permanecer até que as condições do ambiente tornem-se novamente favoráveis a sua sobrevivência (CHASE, 2002). As lesmas reagem à dessecação escavando a terra e cobrindo seu corpo contraído com muco (HYMAN, 1967; CHASE, 2002).

Tem-se observado que a secreção de muco é aumentada pelos moluscos quando estímulos muito fortes são aplicados a eles, de uma maneira geral, sugerindo a relação desta secreção com um mecanismo de defesa destes animais. Em *Aplysia*, por exemplo, a secreção do muco do corpo como um todo é geralmente interpretada como defensiva, prevenindo-se predação e outros perigos aos quais o animal está exposto no meio. Porém, esta liberação é pequena quando comparada à

liberação de muco durante uma estimulação nociva, confirmando a ação defensiva desta secreção (CHASE, 2002). O *M. abbreviatus*, quando submetido a um estímulo térmico aversivo, apresenta uma maior produção de muco e a coloração deste torna-se mais amarelada (ACHAVAL et al., 2005), enquanto que em seu estado normal, o muco apresenta um aspecto claro e fluído. Após serem retirados da placa quente e colocados novamente nos terrários, os caracóis não ficam isolados. Eles se colocam em grupos, uns sobre as conchas dos outros, continuando a secreção de muco translúcido por pelo menos 30 min após o estímulo térmico.

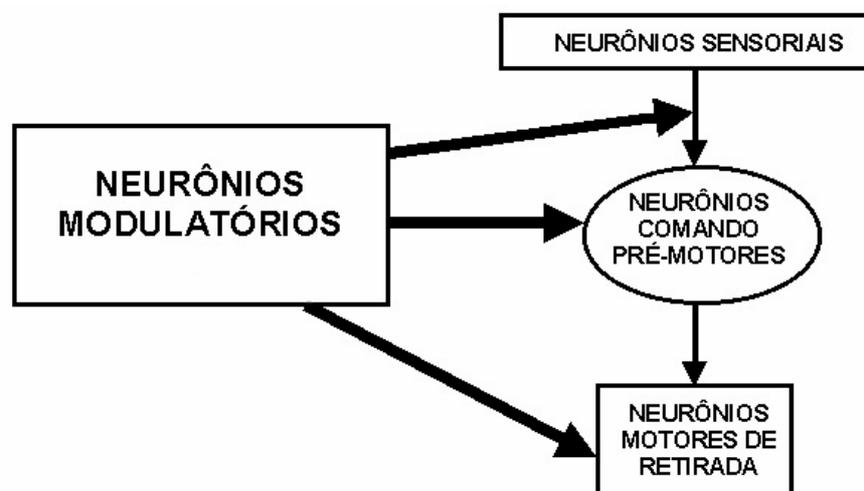


**Figura 1- A:** Representação esquemática do caracol *M. abbreviatus* na primeira fase do comportamento aversivo. Observar os tentáculos orais e palpos labiais retraídos e o aspecto triangular do complexo cabeça-pé quando o caracol é colocado na placa quente. **B:** Representação esquemática da segunda fase do comportamento aversivo do caracol *M. abbreviatus*. Observar que, após protração, o caracol exibe uma elevação anterior do complexo cabeça-pé a 1 cm do substrato, caracterizando o comportamento aversivo (Reproduzido de Achaval et al., 2005).

## 1.2 - CIRCUITOS NEURAIS E NOCICEPÇÃO EM INVERTEBRADOS

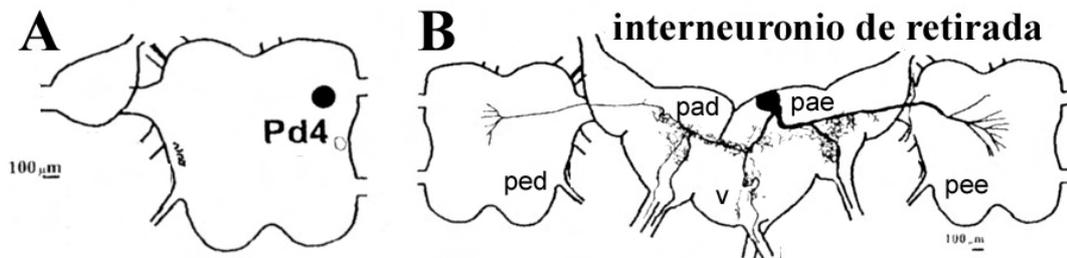
Estudos em *Helix lucorum* têm demonstrado a existência de um circuito neural envolvido no comportamento de retirada após estímulo nociceptivo (ZAKHAROV et al., 1995; BALABAN et al., 2001; BALABAN, 2002). Tal circuito está composto de grupos neuronais diferenciados que participam do comportamento de retirada: neurônios sensoriais, neurônios motores, neurônios modulatórios e neurônios de comando. As células pré-sinápticas aos interneurônios de comando, localizadas na região anterior dos gânglios parietais e nos gânglios pleurais, são os chamados neurônios sensoriais. Os efetores da resposta comportamental são neurônios motores, os quais recebem aferências provenientes dos neurônios sensoriais, respondendo a todos os estímulos externos e evocando reações comportamentais de retirada. Esta resposta usualmente é representada por um pico de duração correspondente à resposta comportamental do animal, e não à duração do estímulo. Os neurônios modulatórios são serotoninérgicos e estão localizados nos gânglios pedais, atuando na modulação da aferência sináptica e da eferência motora durante o reflexo de retirada. Os neurônios de comando são 9 interneurônios pré-motores, localizados nos gânglios pleurais e parietais que recebem aferências sinápticas convergentes e são capazes de disparar os componentes do comportamento de retirada. Tais neurônios estão conectados a receptores periféricos do animal (mecanorreceptores, termorreceptores, quimiorreceptores e fotorreceptores). Ao serem ativados por um estímulo nocivo, os neurônios comando ativam os neurônios motores (BALABAN, 2002).

Os neurônios de comando podem ser assim considerados por satisfazerem os três critérios para neurônios comando introduzidos por Kupfermann e Weiss (1978): o critério da “participação”, pois eles respondem a um estímulo tátil nocivo por uma descarga que precede a resposta comportamental; o critério da “suficiência”, onde a ativação intracelular de um neurônio libera uma parte da resposta de retirada; e o critério da “necessidade”, uma vez que a hiperpolarização do neurônio promove a eliminação do comportamento de retirada. Os neurônios comando reproduzem toda a informação sensorial em uma resposta comportamental. Sabe-se, porém, que um único grupo celular não controla exclusivamente o comportamento em *H. lucorum*, no entanto, estas células são fundamentais no circuito do comportamento de retirada. Desta maneira, nesta espécie de caracol terrestre, um estímulo nocivo promove uma ativação dos neurônios sensoriais, os quais estimulam os neurônios comando que, por sua vez, ativam os neurônios motores, promovendo o comportamento de retirada. Todas as etapas descritas do circuito são reguladas pelos neurônios modulatórios (Fig. 2) localizados nos gânglios pedais (BALABAN, 2002).



**Figura 2** – Representação esquemática do circuito de retirada proposto para *Helix lucorum* (Modificado de Balaban, 2002).

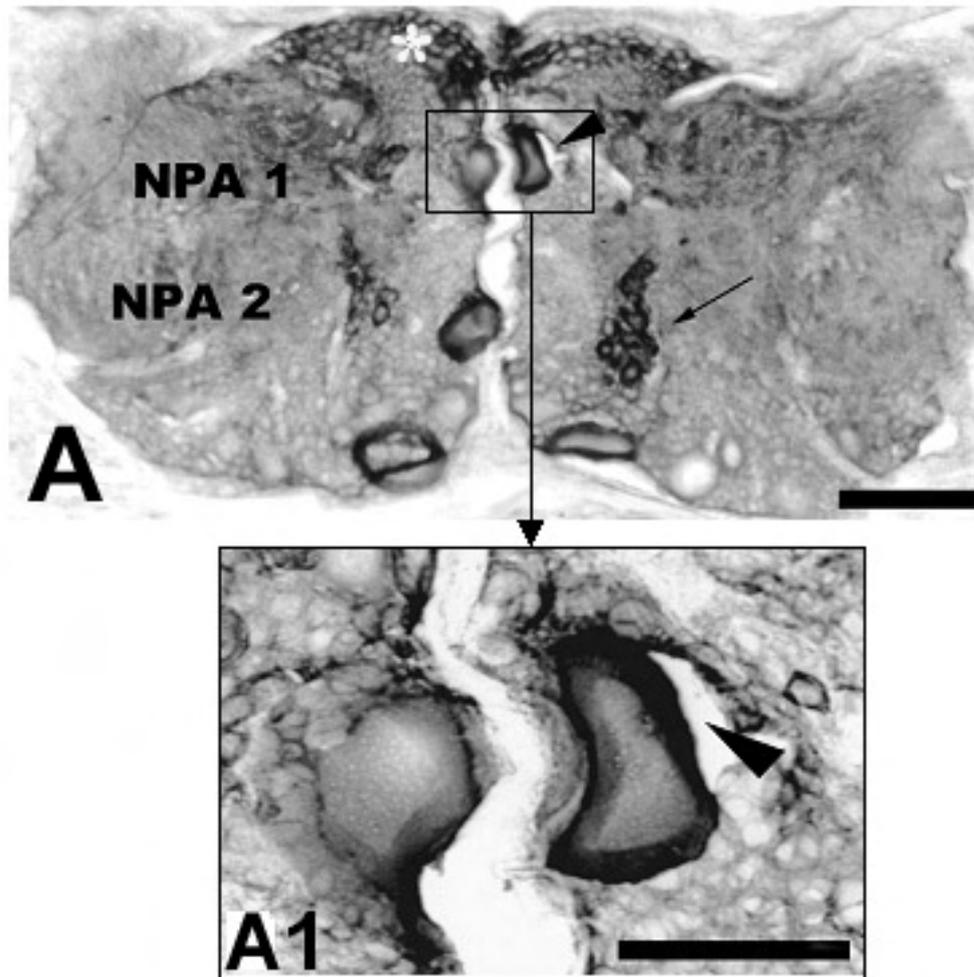
Fazendo parte deste grupo, aparece um neurônio grande denominado Pd4 (Fig. 3), que estaria envolvido na facilitação da resposta sináptica nesta rede de comunicação neural. Esta célula envia processos através das áreas neuropilares e de comissuras até um neurônio comando gigante de retirada localizado no gânglio parietal deste caracol (BALABAN et al., 2001; BALABAN, 2002).



**Figura 3** – Representação esquemática da morfologia e localização dos neurônios modulatórios e comando em *Helix lucorum*. A: Localização das células marcadas com cloreto de cobalto, identificando a localização da célula Pd4 no gânglio pedal. B: Distribuição das ramificações do neurônio gigante no gânglio parietal, que controla o comportamento de retirada neste caracol. ped: gânglio pedal direito; pee: gânglio pedal esquerdo; pae: gânglio parietal esquerdo; pad: gânglio parietal direito; v: gânglio visceral (Modificado de Balaban, 2002).

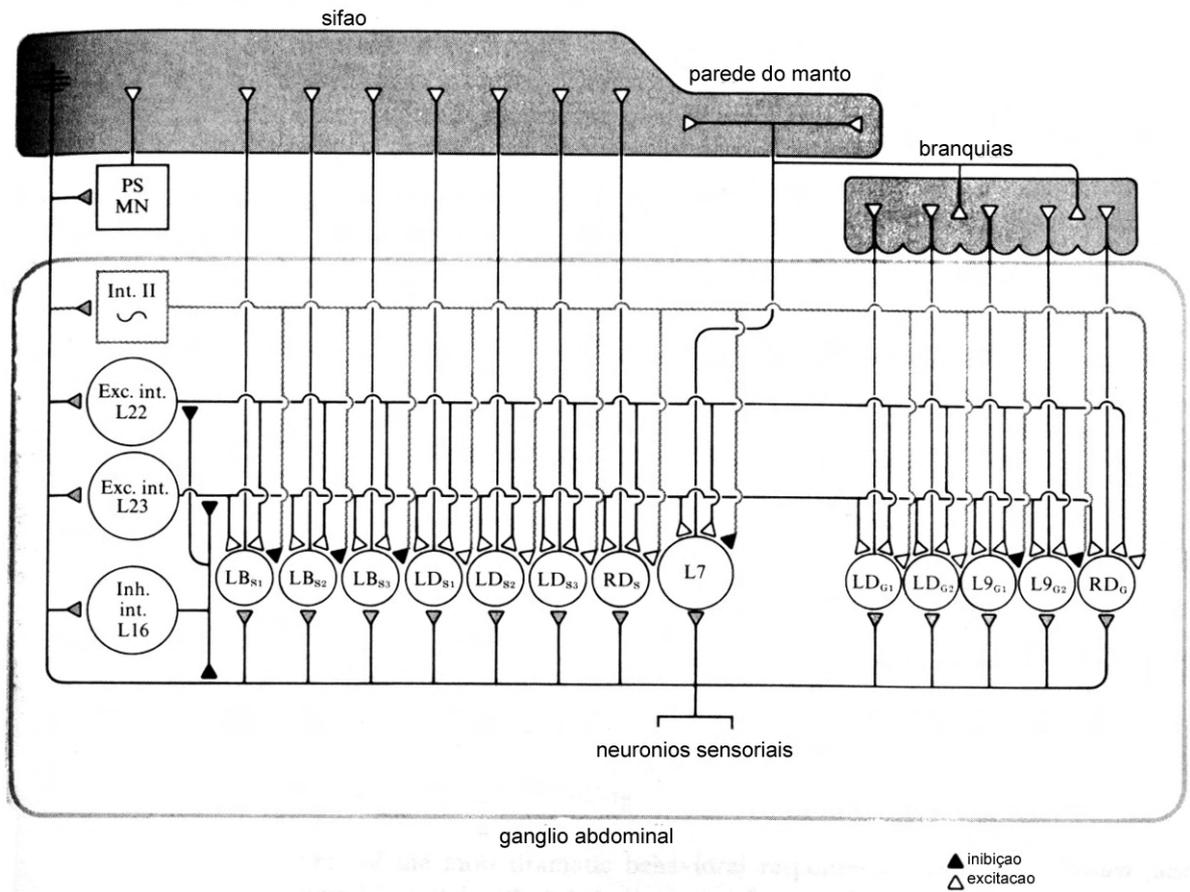
Em *M. abbreviatus*, a imunorreatividade à 5-HT foi detectada em localização similar a neurônios serotoninérgicos modulatórios descritos em *Helix lucorum* (BALABAN et al., 2001; BALABAN, 2002), tais como os neurônios 5HT-ir anteriores nos gânglios pedais e o neurônio grande 5HT-ir, similar ao neurônio Pd4 (Fig. 4), sugerindo que eles possam ser responsáveis pela modulação do comportamento de

retirada, participando do circuito nociceptivo neste caracol (SWAROWSKY et al., 2005).



**Figura 4 – A:** Secção da região ventral do gânglio pedal de *M. abbreviatus* mostrando um grupo de neurônios anteriores 5HT-ir (asterisco branco), grandes neurônios 5HT-ir localizados medialmente e um grupo de neurônios posteriores positivos (seta). **A1:** No detalhe, em maior aumento, um grande neurônio 5HT-ir (cabeça de seta) neste gânglio, provavelmente correspondente ao neurônio Pd4 de *H. lucorum* situado em posição similar e de tamanho semelhante. Barra: 200  $\mu$ m. (Modificado de Swarowsky et al., 2005).

O molusco *Aplysia* responde a estímulos nociceptivos com um reflexo de retirada do corpo e liberação de muco, bem como um reflexo de retirada do sifão e das brânquias, e fuga. Tem-se sugerido que esta função nociceptiva seja provocada pela estimulação de neurônios mecanoaférentes específicos que inervam a cauda, o parapódio, parte do pé e das paredes do corpo da *Aplysia*. Estas células aumentam a descarga a mudanças de pressão progressivas, com respostas máximas a estímulos que podem causar dano tissular (WALTERS, 1987). Os opistobrânquios, tais como *Aplysia californica*, têm uma cabeça e muitos apêndices (tentáculos anteriores, tentáculos posteriores, sifão e brânquias) desprotegidos. Cada um destes órgãos mostra um reflexo de retirada defensiva graduado em resposta ao estímulo aplicado. A cabeça, os tentáculos anteriores e os tentáculos posteriores reagem ao toque. O sifão da *Aplysia* tipicamente se projeta para fora, partindo do meio do parapódio, e as brânquias freqüentemente projetam-se da cavidade do manto; ambos são reflexivamente retirados quando o sifão é tocado, e a intensidade da retirada é relativa à intensidade do estímulo. Existem 5 células motoras localizadas no gânglio abdominal deste molusco que movem apenas as brânquias ( $LD_{G1}, LD_{G2}, L9_{G1}, L9_{G2}, RD_G$ ), 7 células motoras que movem apenas o sifão ( $LB_{S1}, LB_{S2}, LB_{S3}, LD_{S1}, LD_{S2}, LD_{S3}, RD_S$ ), e uma célula que move o sifão, as brânquias e as paredes do manto (L7) (Fig. 5). Além disso, há um grupo de aproximadamente 30 células motoras do sifão localizadas periféricamente (neurônios motores periféricos). As células motoras centrais e as periféricas são inervadas por vários interneurônios sensoriais e por dois grupos de neurônios sensoriais mecanorreceptores (aproximadamente 24 neurônios em cada grupo). Um destes grupos inerva a pele do sifão e a parede posterior do manto, e o outro inerva a parede anterior do manto (KANDEL, 1979).



**Figura 5** - Esquema do circuito neural que controla os reflexos de retirada do sifão e das brânquias em *Aplysia* em resposta a um estímulo tátil aplicado ao integumento do sifão. Um estímulo fraco ativa um número de células mecanorreceptoras que excitam todas as células motoras das brânquias e do sifão, bem como os dois interneurônios excitatórios (L22 e L23) e um interneurônio inibitório (L16). Interneurônios inibitórios (Inh. Int.), interneurônios excitatórios (Exc. Int.), interneurônio secundário (Int. II) (Modificado de Kandel, 1979).

Assim, o estímulo do tecido promove o processo de transdução ou ativação do receptor, onde a energia produzida pelo agente causal é convertida em impulso nervoso eletroquímico, sendo transmitida às estruturas do SNC, onde se produz a sensação nociceptiva (ACHAVAL, 1991). Esta mensagem provoca as respostas comportamentais relativas à proteção tecidual, como as respostas de retirada.

### **1.3– MODULAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA EM INVERTEBRADOS**

Existem vias descendentes supressoras da dor em diferentes níveis do SNC, ativadas por opióides ou por serotonina (5-HT). Estudos têm demonstrado a possibilidade de medir a analgesia produzida por estas vias, em modelos animais para estudo de dor crônica, através da estimulação elétrica e da administração de opióides ou de 5-HT, diminuindo eficientemente a dor (LEVINE et al., 1980; ABBOTT & MELZACK, 1982; BARDIN et al., 2000). Existem evidências de mecanismos modulatórios básicos que foram filogeneticamente conservados em gastrópodos, destacando o envolvimento de peptídeos opióides e de 5-HT na nocicepção, de potenciação de longa duração (LTP) e a sensibilização de nociceptores, além da facilitação e inibição de reflexos de retirada (DYAKONOVA et al., 1995; KAVALIERS et al., 1997; KAVALIERS et al., 2001).

Peptídeos opióides e seus receptores bioquímicos foram identificados em várias espécies de invertebrados através de análises comportamentais, eletrofisiológicas e bioquímicas, mostrando que estas substâncias são semelhantes às dos vertebrados e estão envolvidas na mediação de respostas comportamentais a estímulos térmicos em alguns gastrópodes. Parece que o sistema opióide presente nos invertebrados é análogo ao seu correspondente em mamíferos (KAVALIERS & HIRST, 1984). Assim, sabendo-se das respostas de mamíferos a agentes estressores, que mostram que o seu encéfalo possui sistemas neuroquímicos opióides e não-opióides envolvidos na resposta a estímulos ambientais aversivos e nocicepção, existem evidências de que os opióides também participem na modulação de comportamentos e na fisiologia de invertebrados. Os moluscos podem servir de modelos experimentais nas avaliações dos efeitos comportamentais de

peptídeos biologicamente ativos encontrados em vertebrados, bem como de seus análogos sintéticos (KAVALIERS et al., 1983).

Em *M. abbreviatus*, a administração de diferentes concentrações de morfina antes do estímulo térmico promoveu um aumento da resposta de latência no comportamento de retirada do caracol, o qual apresenta uma primeira fase comportamental menos intensa do que a observada em animais sem tratamento, e uma segunda fase com uma parcial protração dos palpos e tentáculos orais, os quais apresentaram-se flácidos. Ao receber altas doses de morfina, o caracol mostra uma rigidez muscular antes mesmo de receber o estímulo térmico aversivo. Por outro lado, a administração de naloxone promoveu uma diminuição na resposta de latência do caracol, o qual exibe o comportamento bifásico mais rapidamente do que o animal que não recebe o tratamento. Assim, com a administração de morfina, o caracol aumenta a latência ao estímulo aversivo e, no entanto, com naloxone, diminui a latência ao estímulo (ACHAVAL et al., 2005). A resposta comportamental em *Cepaea nemoralis*, *Limax maximus* e *Megalobulimus sanctipauli* (KAVALIERS & HIRST, 1986; HIRST & KAVALIERS, 1987; ROMERO et al., 1994) após a administração de morfina antes da exposição dos animais ao estímulo térmico aversivo resultou em um significativo aumento na latência do comportamento aversivo destes caracóis. Além disso, a latência aumentada em resultado à administração de morfina após o estímulo térmico pode ser suprimida pelo antagonista opióide naloxone (KAVALIERS & HIRST, 1986; WALTERS, 1987; ROMERO et al., 1994). Assim, nestes gastrópodes a habilidade do naloxone em produzir um completo bloqueio da analgesia pela morfina indica que um receptor  $\mu$

está relacionado a tal comportamento (ROMERO et al., 1994; NESTLER et al., 2001), o que também é sugerido para *M. abbreviatus* (ACHAVAL et al., 2005).

Estudos realizados em modelos de invertebrados, incluindo gastrópodes, mostram que a 5-HT funciona como um neurotransmissor e neuromodulador no SNC e exerce um importante papel nas condições homeostáticas básicas nestes moluscos, incluindo alimentação, reprodução, locomoção, secreção neuro-hormonal, função cardiovascular, aprendizado, sensitização e comportamento de retirada (ZANCAN, 1996; SWAROWSKY et al., 2005). Por outro lado, no SNC de humanos a 5-HT atua como neurotransmissor, desempenhando importantes papéis fisiológicos na modulação do humor, impulso, apetite, temperatura corporal, secreção neuroendócrina, sono e nocicepção, encontrando-se também envolvida em distúrbios psiquiátricos, como agressividade, suicídio violento, ansiedade e depressão, transtornos obsessivo-compulsivo e do apetite, psicose e outros. Estudos realizados em invertebrados e vertebrados permitiram chegar à conclusão de que a 5-HT está amplamente distribuída nestes dois grupos animais, mediando inúmeras funções fisiológicas graças à multiplicidade de receptores (WALCOURT et al., 1994; TIERNEY, 2001).

O comportamento de *M. abbreviatus* quando tratado com 5-HT e logo após submetido a um estímulo térmico aversivo mostram a existência de circuitos neurais serotoninérgicos responsáveis por comportamentos básicos, como a resposta a estímulos aversivos. Tal estudo comprova a existência de receptores 5-HT em *M. abbreviatus*, uma vez que a administração desta substância promove modificações motoras e comportamentais, além de causar uma diminuição nas respostas de latência do comportamento aversivo deste animal. A utilização de metisergida, um antagonista não seletivo dos receptores 5-HT, quando administrada isoladamente

também é capaz de diminuir as respostas de latência do *M. abbreviatus*, produzindo também um efeito nociceptivo, semelhante ao da 5-HT, talvez por se ligar de maneira antagônica e específica a um determinado tipo de receptor e facilitar a ação da 5-HT endógena sobre os demais tipos de receptores. Porém, quando associada a 5-HT, a metisergida anula os efeitos nociceptivos da serotonina, o que pode estar relacionado com o bloqueio da ação da 5-HT endógena sobre um tipo específico de receptor (PENHA, 2001).

A presença de neurônios serotoninérgicos já foi determinada no SNC de *M. abbreviatus* em experimentos usando injeções da neurotoxina agonista 5,7-diidroxitriptamina (5,7-DTH), por detecção histoquímica usando ácido glioxílico (ZANCAN et al., 1997) e por imunohistoquímica (SWAROWSKY et al., 2005). Assim, os estudos comportamentais e histoquímicos realizados nesta espécie revelam homologias celulares e comportamentais com outros moluscos, tais como *Aplysia californica*, *Tritonia diomedea* (FICKBOHM et al., 2001), *Helix lucorum* (BALABAN et al., 2001; BALABAN, 2002) e *Cepaea nemoralis* (DYAKONOVA et al., 1995)

#### **1.4– REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR ESTÍMULOS EXÓGENOS: A AÇÃO DOS PROTO-ONCOGENES**

A integração da resposta celular a uma molécula sinalizadora se dá através de um acoplamento do estímulo extracelular à via efetora intracelular. Quando tais estímulos não são capazes de atravessar a membrana celular, eles irão promover modificações na molécula de segundo mensageiro, o que pode levar à indução de

genes precoces imediatos que codificam fatores de transcrição, os quais irão regular a expressão de genes-alvo secundários (MORGAN & CURRAN, 1989). Assim, estímulos extrínsecos induzem a expressão gênica, cujos produtos proteicos acoplam sinais extracelulares a alterações fenotípicas, através da sua atuação no sistema de transcrição dos genes-alvo, por meio de moléculas nucleares que formam parte da cascata do acoplamento estímulo-transcrição, promovendo o aparecimento de respostas de longa duração (MORGAN & CURRAN, 1991; TÖLLE et al., 1994; SAADÉ et al., 1997; HARRIS, 1998; PRADO & DEL BEL, 1998; COBELLIS et al., 1999).

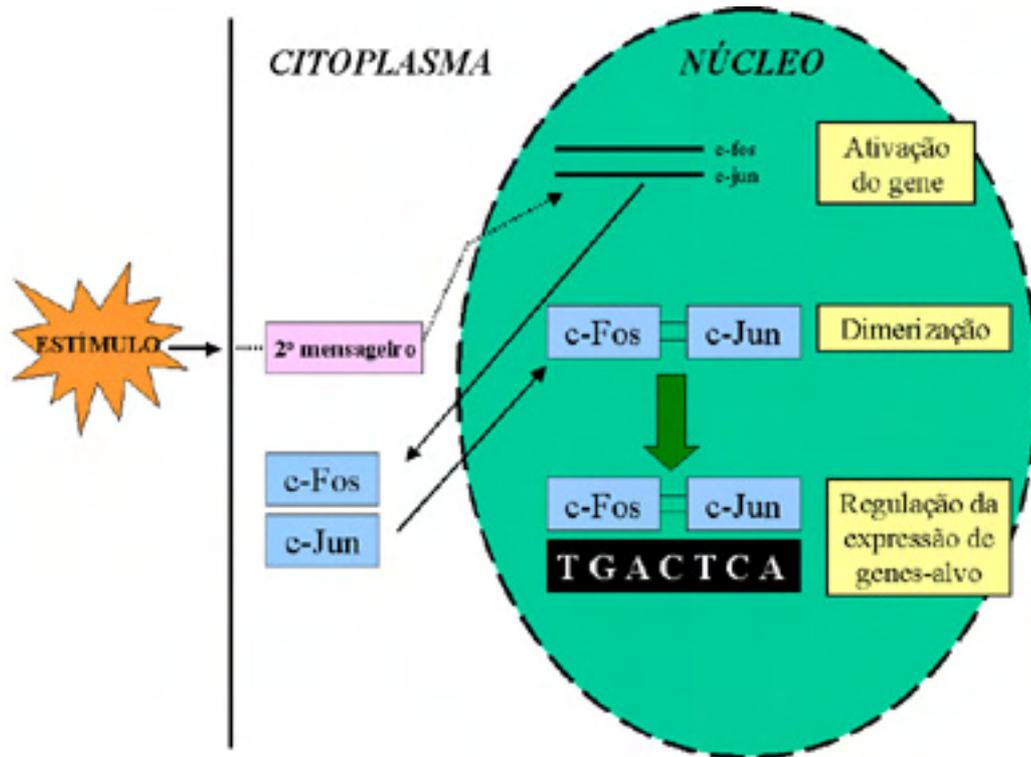
Tem sido postulado que alguns proto-oncogenes nucleares, aqueles que funcionam como fatores de transcrição que são de rápida indução, constituiriam o terceiro elo de sinalização intracelular ao atuarem como terceiros mensageiros no acoplamento de mudanças na expressão gênica que serão a base de processos de resposta/adaptação celular a médio ou longo prazo. Dentre estes proto-oncogenes nucleares os membros das famílias Fos e Jun são os mais estudados (GOELET et al., 1986; MORGAN et al., 1987; SAADÉ, et al., 1997; HARRIS, 1998; PRADO & DEL BEL, 1998; COBELLIS et al., 1999).

O proto-oncogene c-fos codifica a proteína c-Fos, com 380 aminoácidos e peso molecular de 55-62 Kd, localizada principalmente no núcleo celular, pertencente à família Fos, a qual é composta também por outras proteínas como FosB, FRA-1, FRA-2 e seu “spliced” alternativo  $\Delta$ FosB (33Fos-like), codificadas por genes diferentes, apresentando pesos moleculares, tempos de meia-vida e características também diferenciadas (MORGAN & CURRAN, 1989; FONTA et al., 1995; KOVÁCS, 1998; NESTLER et al., 2001) (Tabela 1).

<b>Peso Molecular</b>				
<b>Proteína</b>	<b>[KDa]</b>	<b>Meia-Vida</b>	<b>Gene</b>	<b>Características</b>
c-Fos	55	2h	c-fos	Rápida indução por mudanças agudas
FosB	46/48	9,5h	fosB	Indução lenta por mudanças agudas
33Fis-like	33	10h	fosB/ $\Delta$ fosB	Induzido por mudanças agudas
Fra-1	35	28h	fosB/ $\Delta$ fosB	Em resposta a estímulo crônico/repetido
Fra-2	37	208h	fosB/ $\Delta$ fosB	Em resposta a estímulo crônico/repetido

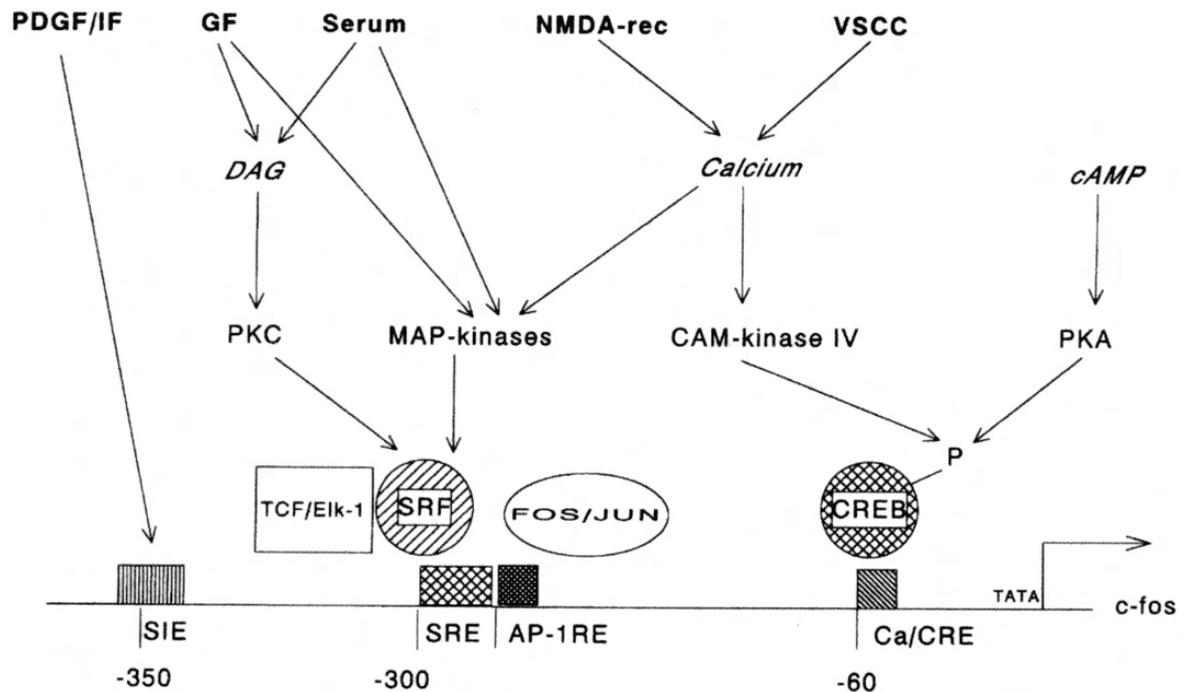
Tabela 1 – Algumas características selecionadas dos fatores de transcrição da família Fos (Modificado de Kovács, 1998).

Após a estimulação, observa-se em mamíferos que a transcrição do c-fos é um processo rápido e transitório (MORGAN & CURRAN, 1989; FONTA et al., 1995; HARRIS, 1998) no qual o RNA mensageiro (RNAm) se acumula no citoplasma por 1 a 2 horas e a proteína c-Fos é traduzida. Em seguida, tal proteína é deslocada para o núcleo celular, através da formação de um heterodímero com a proteína c-Jun, o que é necessário para a ligação ao sítio regulador AP-1, do DNA (TGACTCA) onde age para regular a expressão de genes-alvo (Fig. 6) (MORGAN & CURRAN, 1989; MORGAN & CURRAN, 1991; NARANJO et al., 1991a,b; HARRIS, 1998). Por possuir também uma vida relativamente curta, a proteína c-Fos apresenta características de um sistema de sinalização (MORGAN & CURRAN, 1989).



**Figura 6** – Papel da c-Fos e c-Jun na transdução do sinal nuclear. Um estímulo extracelular exerce mudanças na molécula de segundo mensageiro levando a uma indução da transcrição de c-fos e c-jun. Segue-se a tradução no citoplasma e as proteínas c-Fos e c-Jun codificadas por tais genes, respectivamente, são rapidamente translocadas para o núcleo onde elas formam um complexo heterodimérico que se liga com alta afinidade ao sítio AP-1 do DNA, regulando a transcrição de genes-alvo (Adaptado de Morgan & Curran, 1989).

Nesta região regulatória do gene c-fos também podem agir outros elementos, tais como o elemento de resposta ao  $\text{Ca}^{2+}$ /AMPc (CRE), elemento de resposta ao soro (SER) e o elemento sis-induzível (SIE) (Fig. 7). Esta particularidade confere uma variedade de sinais sinápticos, comumente mediados através de vias de transdução de sinais interdependentes, como as cascatas da proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (KOVÁCS, 1998).



**Figura 7** – Representação esquemática da região regulatória do gene *c-fos* indicando os principais elementos regulatórios: o elemento de resposta ao cálcio e AMPc (Ca/CRE), o elemento de resposta do soro (SER), o sítio de ligação ativador de proteína (AP-1RE) e o elemento sis-induzível (SIE). O fator de resposta do soro, o fator complexo ternário EIK-1 (TCF/EIK-1) e a proteína de ligação do elemento de resposta ao AMPc (CREB) são alvos de diferentes sistemas de transdução, incluindo proteínas quinases A e C (PKA e PKC), proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina (CaMK) e quinases ativadas por mitógeno (MAPK). Outras abreviações: PDGF, fator de crescimento derivado de plaqueta; GF, fatores de crescimento; VSCC, canal de cálcio dependente de voltagem (Reproduzido de Kovács, 1998).

Tal cascata de sinalização opera em todas as células em resposta a diversas formas de estímulos que podem provocar a expressão da proteína *c-Fos* no sistema nervoso central em vertebrados. A proteína se expressa temporariamente em neurônios após estimulação sináptica, visto que a expressão basal de *c-Fos* é relativamente baixa na maioria das regiões do SNC, o que permite correlacionar a

atividade neuronal com a presença da proteína c-Fos (MORGAN et al., 1987; HUNT et al., 1987). Assim, a expressão de c-Fos é uma chave da cascata de eventos moleculares os quais seguem à ativação neuronal (SAADÉ et al., 1997).

No entanto, tem sido observado que em animais não mamíferos, como anfíbios, por exemplo, também ocorre uma expressão crônica da proteína c-Fos, mas as mudanças na atividade da proteína parecem não ser restritas a períodos tão curtos como descritos em mamíferos. Além disso, a expressão da proteína c-Fos em *Rana esculenta* varia de acordo com as estações do ano, onde neurônios Fos-ir foram encontrados no encéfalo de animais coletados em março, de maio a julho e de setembro a novembro, sendo que a maior densidade de corpos celulares imunorreativos foram encontrados em animais coletados em julho. Em contraste, o encéfalo de rãs coletadas em janeiro, fevereiro, abril e dezembro não exibiram nenhuma imunorreatividade à c-Fos. Surpreendentemente, além da localização nuclear, a proteína c-Fos foi também detectada no citoplasma. Em particular, nos animais coletados em março a Fos-ir foi detectada tanto no núcleo quanto no citoplasma de diferentes corpos celulares. Os animais coletados em maio, junho, setembro, outubro e novembro exibiram somente imunorreatividade citoplasmática à c-Fos, ao passo que animais coletados em julho apresentaram uma alta densidade de imunomarcção apenas no núcleo. Estes resultados mostram que a localização exclusiva do complexo AP1 no compartimento nuclear da célula não deve ser considerada um dogma, uma vez que a imunorreatividade à c-Fos aparece exclusivamente no citoplasma de neurônios durante períodos bem determinados do ano (COBELLIS et al., 1999). Confirmando estes dados, as células do encéfalo de abelhas, também expressaram imunorreatividade à c-Fos no citoplasma, além de sua localização nuclear (FONTA et al., 1995). Em anfíbios da espécie *Rana*

*catesbeiana*, após lesão periférica ocasionada por secção do nervo ciático da pata posterior do animal, a expressão da proteína c-Fos é predominantemente encontrada no núcleo em neurônios motores da medula, na porção medial do corno ventral, na banda médio-lateral e nos funículos dorsal, ventral e lateral. O contrário é observado nos gânglios da raiz dorsal, tanto ipsi quanto contralaterais à lesão, onde a imunorreatividade à c-Fos predomina no citoplasma neuronal (ROSSATO, comunicação pessoal).

O promotor c-fos responde a agentes que ativam tanto a via da proteína quinase C intracelular como a via da adenilato ciclase (MORGAN & CURRAN, 1991). Tem-se sugerido que a indução da expressão da proteína c-Fos depende da elevação dos níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular, que decorre de seu influxo através de canais de  $Ca^{2+}$  tipo NMDA ou dependente de voltagem, após a ativação de receptores por aminoácidos excitatórios. Outras evidências sugerem que a expressão da proteína c-Fos depende da interação entre o  $Ca^{2+}$  que entra na célula por canais tipo NMDA e a estimulação de segundos mensageiros ligados a receptores metabotrópicos, como o diacilglicerol (DAG), ativando proteínas quinases (PRADO & DEL BEL, 1998).

No SNC de mamíferos a indução do proto-oncogene c-fos tem sido observada após a aplicação de agentes convulsivantes, estimulação elétrica, estimulação sensorial e estresse (MORGAN et al., 1987; DRAGUNOW & ROBERTSON, 1987; HUNT et al., 1987; NARANJO et al., 1991a; COBELLIS et al., 1999). Esta situação é rápida e transitória, e relaciona-se à indução imediata de genes que codificam proteínas como a tirosina hidroxilase, encefalinas, dinorfinas, fatores de crescimento, que mediarão a resposta posterior do sistema (SONNENBERG et al., 1989; NARANJO et al., 1991 a, b; ACHAVAL, 1991).

Na medula espinhal de ratos, após a estimulação nociceptiva somática e visceral, pela ativação de termorreceptores, quimiorreceptores e mecanorreceptores de alto limiar, produz-se uma ativação do proto-oncogene fos nos neurônios das diferentes lâminas do corno dorsal (HUNT et al., 1987; MENÉTREY et al., 1989). Além destas áreas medulares, também tem sido demonstrada a expressão da proteína c-Fos em outras regiões do neuro-eixo envolvidas na nocicepção (BULLITT, 1990; ACHAVAL, 1991). Assim, a detecção de c-Fos pode ser utilizada para fazer uma fina marcação das áreas precisas que são ativadas por estimulação nociva, bem como para revelar a distribuição geral das populações neuronais que respondem à estimulação (HARRIS, 1998). Isso sugere que c-Fos pode representar um marcador de atividade neuronal (MORGAN & CURRAN, 1989; FONTA et al., 1995; JENNINGS & FITZGERALD, 1996; BEREITER, 1997; COBELLIS et al., 1999). No entanto, a maior limitação desta tecnologia é que a proteína c-Fos não marca células com uma rede sináptica inibitória (KOVÁCS, 1998).

A imunistoquímica para detectar c-Fos tem sido freqüentemente usada como marcador para atividade neuronal em vários níveis no SNC. A descrição inicial da expressão da c-Fos na medula espinhal seguida da estimulação periférica levou a vários estudos na tentativa de correlacionar a expressão diferencial do gene c-fos e o processamento da informação nociceptiva (SAADÉ et al., 1997).

Estudos visando estabelecer a relação entre o comportamento animal e os circuitos neurais envolvidos nas respostas nociceptivas, mostraram que existem vias descendentes supressoras da dor localizadas em diferentes níveis do sistema nervoso central, as quais são ativadas por opióides ou por serotonina (5-HT), produzindo analgesia quando mensuradas por testes como “hot plate” e “tail flick” em modelos de dor crônica (LEVINE et al., 1980; ABBOTT & MELZACK, 1982; BARDIN

et al., 2000). A maioria das pesquisas tem sido realizadas em ratos, mas se tem mostrado que a estimulação nociva induz a expressão de c-Fos em camundongos, gatos, cobaias (HARRIS, 1998), anfíbios (COBELLIS et al., 1999; ROSSATO, comunicação pessoal), abelhas (FONTA et al., 1995). Na grande maioria destes estudos, a expressão da proteína c-Fos foi utilizada como um marcador funcional para identificar atividade em neurônios responsivos à estimulação nociva, estabelecendo onde a nocicepção é modulada por uma dada manipulação. Assim, cada um deles tem confirmado a relação entre nocicepção e expressão da proteína c-Fos, estabelecendo sua identificação como uma valiosa ferramenta para estudos de correlatos neurais e nocicepção (HARRIS, 1998).

Na medula espinhal, a ligação entre nocicepção e expressão de c-Fos é estabelecida pelo fato de que a maioria das manipulações que afetam reflexos nociceptivos e outros comportamentos relacionados à dor similarmente modificam a expressão de c-Fos. Esta expressão de c-Fos induzida por nocicepção em neurônios espinhais é suprimida pela administração de drogas analgésicas, incluindo morfina, indometacina e ketoprofen, bem como por outras drogas que interferem no processamento nociceptivo ao nível espinhal, tais como noradrenalina, antagonistas dos receptores NMDA para glutamato e compostos que inibem a síntese de óxido nítrico (HARRIS, 1998).

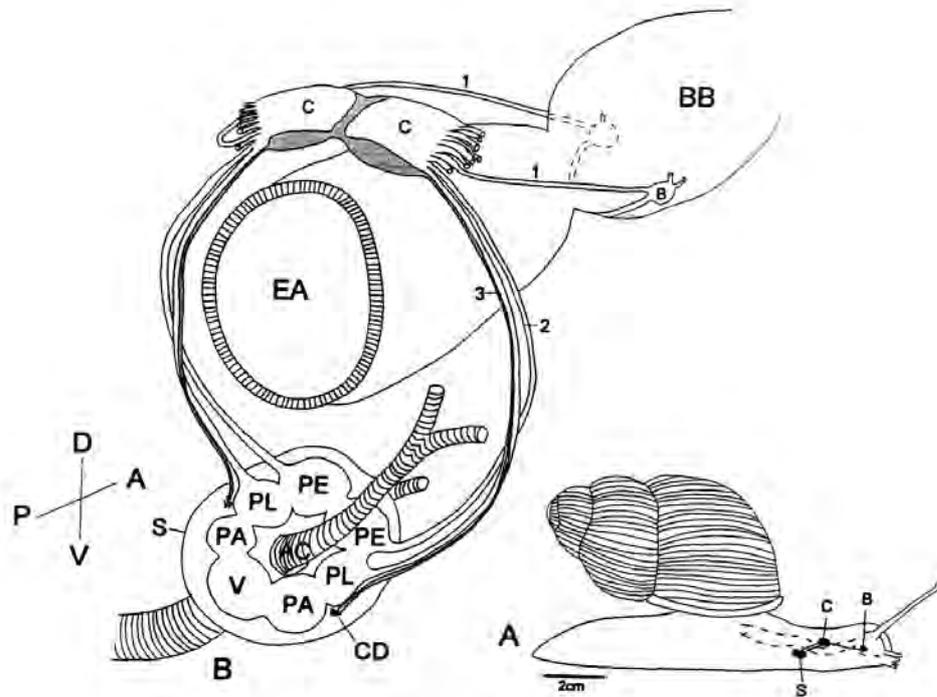
Inúmeros estudos em mamíferos têm mostrado que o pré tratamento com morfina reduz a expressão de c-Fos induzida por estímulos nocivos (TÖLLE et al., 1994; BEREITER, 1997; SAADÉ et al., 1997; HARRIS, 1998; TAYLOR et al., 1998). A expressão de c-Fos em neurônios espinhais de rato induzida por estimulação térmica nociva (imersão da pata em água a 50°C) é fortemente suprimida por morfina (HARRIS, 1998).

Manipulações que causam antinocicepção, tal como a estimulação dos núcleos da rafe ou a administração de agonistas  $\mu$ -opioides periféricamente ou centralmente, reduzem o número de neurônios Fos-ir no corno dorsal da medula espinhal. Também drogas analgésicas como morfina ou somatostatina podem reduzir o número de neurônios imunorreativos entre os subnúcleos interpolar e caudal e também na transição entre os subnúcleos caudal e superior cervical da medula (BEREITER, 1997). O número de neurônios Fos-ir responsivos à estimulação nociceptiva também parece ser menor na presença de anestésicos e maior na sua ausência, mostrando forte correlação entre presença de c-Fos em neurônios envolvidos na via da dor e nocicepção (MORGAN & CURRAN, 1989; MENÉTREY et al., 1989).

### **1.5– SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO *M. abbreviatus***

O SNC do caracol terrestre *M. abbreviatus* está formado por 11 gânglios: 7 formam o complexo subesofageano (2 gânglios pedais, 2 gânglios pleurais, 2 gânglios parietais e 1 gânglio visceral), 2 gânglios cerebrais, conectados ao complexo subesofageano por conetivos cérebro-pedais e cérebro-pleurais, e 2 gânglios bucais, conectados aos gânglios cerebrais através dos conetivos cérebro-bucais (Fig. 8). Os gânglios que formam o anel subesofageano estão organizados ao redor da artéria cefálica, e encontram-se unidos entre si por conetivos neurais extremamente curtos. Os gânglios de cada lado são geralmente similares em

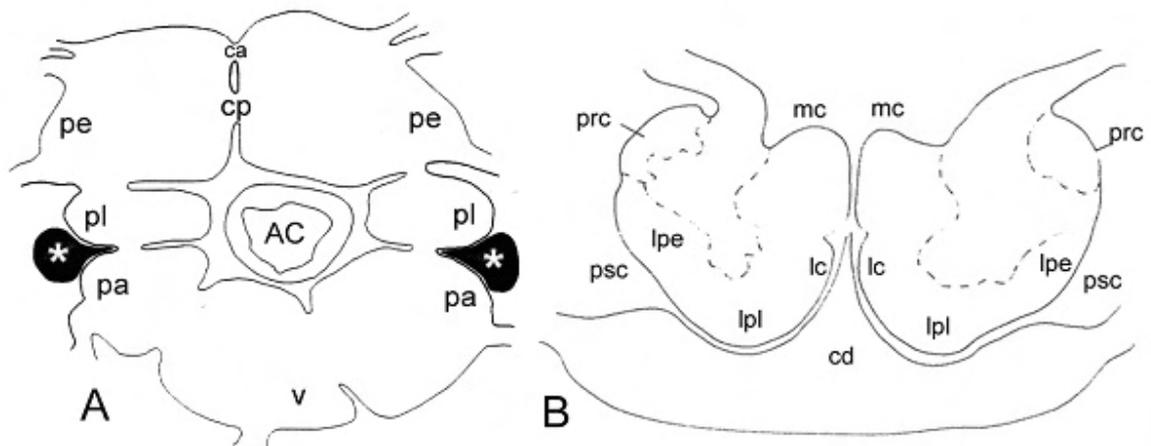
tamanho e forma, sendo apenas o gânglio parietal direito consideravelmente maior que o esquerdo (ZANCAN, 1996).



**Figura 8 – A:** Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, locomovendo-se, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (B), cerebrais (C) e do complexo ganglionar subesofageal (S), unidos entre si pelos conetivos neurais cérebro-bucal (1), cérebro-pedal (2) e cérebro-pleural (3). **B:** Representação esquemática dos gânglios que constituem o sistema nervoso central. EA, artéria cefálica; BB, bulbo bucal; CD, corpo dorsal; EA, esôfago anterior; PA, gânglios parietais; PE, gânglios pedais; PL, gânglios pleurais; V, gânglio visceral. Orientação da figura: Dorsal (D), Ventral (V), Anterior (A), Posterior (P). (Reproduzido de Zancan, 1996).

O par de gânglios pedais está conectado entre si por duas comissuras bastante curtas: uma central, ou comissura principal, de maior diâmetro, e uma menor ântero-ventral, ou comissura anterior (fig. 9-A). Os gânglios cerebrais também encontram-se unidos por uma curta comissura, a comissura cerebral, e podem ser divididos em três áreas: pró-cérebro, mesocérebro e pós-cérebro. Este último, por sua vez, está subdividido em lobo comissural, localizado na posição pósteromedial;

lobo pleural, situado entre a área comissural e a emergência do conetivo cérebro-pleural; e o lobo pedal, entre as emergências dos conetivos cérebro-pleural e cérebro-pedal (BULLOCK & HORRIDGE, 1965; ZANCAN, 1996) (fig. 9-B).



**Figura 9 – A:** Representação esquemática do complexo subesofageano. AC, artéria cefálica; pe, gânglio pedal; ca, comissura anterior; cp, comissura principal; pl, gânglio pleural; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; prolongamento do corpo dorsal (asterisco branco). **B:** Representação esquemática do gânglio cerebral. mc, mesocérebro; prc, pró-cérebro, psc, pós-cérebro; lpe, lobo pedal; lpl, lobo pleural; lc, lobo comissura; cd, corpo dorsal. A este nível de secção não se observa a comissura cerebral (Adaptado de Zancan, 1996).

### 1.6– MEDIADORES QUÍMICOS NO SNC DO *M. abbreviatus*

Os mediadores químicos estão divididos em duas classes gerais de sinalizadores: as amins, que são sintetizadas diretamente de aminoácidos e formadas por reações relativamente simples, e os peptídeos, que são modificados

por um ou mais genes e sintetizados por uma cascata de reações de transcrição e translação.

Torna-se cada vez mais evidente que as monoaminas e os neuropeptídeos exercem um papel importante no controle e na modulação de comportamentos em muitos organismos. Estas ações neuromodulatórias podem variar de efeitos específicos de membrana, os quais alteram o padrão de atividade de neurônios determinados ou de vias neuronais, a papéis obrigatórios em nível de organismo (KAVALIERS, 1988a).

Entre as aminas metiladas, a mais amplamente difundida em transmissões sinápticas é a acetilcolina (ACh), que é encontrada em todos os grupos animais, com exceção dos poríferos (FLOREY, 1963; BULLOCH & HORRIDGE, 1965). O estabelecimento da ACh como mediador químico nas sinapses nervo-nervo e nervo-músculo tem sido proposto em diversos grupos de invertebrados (BULLOCH & HORRIDGE, 1965; WALKER & HOLDEN-DYE, 1989). A junção neuromuscular é uma localização comum da ACh, reconhecida como neurotransmissor excitatório nestas sinapses em invertebrados como nematodas, anelídeos e moluscos (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989). A ampla distribuição da ACh e das enzimas de síntese e degradação, em organismos como bactérias, fungos, protozoários e mesmo em plantas, fornece evidências consideráveis de que a ACh precedeu em termos evolutivos o surgimento do SN e de sinapses funcionais. Mesmo em organismos superiores a ACh é encontrada no tecido não-nervoso, como a córnea, alguns epitélios ciliados, no baço de ungulados e na placenta humana, existindo também algumas evidências de que ela atue no desenvolvimento e diferenciação dos tecidos (TAYLOR & BROWN, 1999). O papel funcional da ACh em invertebrados é bem conhecido, e sua ação farmacológica, assim como de seus antagonistas e

agonistas, foi amplamente investigada, sendo que o conhecimento de seus efeitos nos invertebrados é provavelmente tão antigo quanto as observações de suas ações nos vertebrados (FLOREY, 1963). A ação da ACh varia, dependendo do filo de invertebrados, sendo que nos gastrópodes ela atua como mediador químico nas sinapses motoras e interneurais (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989; ELLIOTT & KEMENES, 1992). Dentre as enzimas com capacidade de catalisar a hidrólise da ACh (esterases) está a acetilcolinesterase (AChE), promovendo a ocorrência desta hidrólise nas sinapses colinérgicas, tanto em vertebrados quanto em invertebrados. Grande atividade da AChE foi descrita para gânglios nervosos de cefalópodes e insetos, onde a concentração desta é bem superior à encontrada no SNC de mamíferos (PROSSER, 1991). Além dos cefalópodes, uma alta concentração de ACh também foi descrita para outros moluscos (GERSCHENFELD, 1973).

No SNC de *M. abbreviatus* foi demonstrada histoquimicamente a atividade enzimática da AChE. Esta reação foi observada na camada neuronal cortical e neuropilo dos gânglios, comissuras, conetivos e nervos, sendo que a mais forte reação positiva neuronal ocorreu nos gânglios pedais e bucais. Também observou-se uma reação AChE de intensidade forte através de todo o neuropilo dos gânglios pedais. Estes dados sugerem que estas áreas positivas à AChE estejam envolvidas em circuitos colinérgicos, sendo que a atividade AChE está associada à presença de ACh atuando como neurotransmissor nestes circuitos (ZANCAN et al., 1994). Estes dados foram confirmados através da detecção da AChE em fibras nervosas de diferentes diâmetros e gânglios de tamanhos variados por toda a extensão da musculatura pediosa deste caracol, além de neurônios positivos distribuídos entre as células epiteliais no epitélio do pé do animal (FACCIONI-HEUSER, 1999). Assim, pode-se fazer uma correlação da atividade da AChE no plexo pedioso de *M.*

*abbreviatus* com a presença de prováveis circuitos colinérgicos nos gânglios pedais, sugerindo que estruturas nervosas deste plexo estejam também envolvidas nestes circuitos, promovendo a locomoção (ZANCAN, 1996; FACCIONI-HEUSER, 1999). Além disso, a presença de neurônios positivos à AChE nos gânglios cerebrais desta espécie de caracol sugere o seu envolvimento no metabolismo de neuropeptídeos (ZANCAN, 1996).

As monoaminas são moléculas amplamente conhecidas como neurotransmissores, sendo derivadas de aminoácidos. Entre elas estão as catecolaminas, termo que se refere aos compostos orgânicos que possuem um núcleo catecol (um anel benzeno com dois substituintes hidroxila adjacentes) e um grupo amina. Entre as catecolaminas destacam-se a dopamina (diidroxifeniletalamina) e seus produtos metabólicos, a noradrenalina e a adrenalina. A dopamina é sintetizada a partir do aminoácido tirosina, através da tirosina hidroxilase. Outro composto relacionado às catecolaminas é a octopamina (fenolamina), que também é sintetizada a partir da tirosina e possui apenas uma hidroxila no anel benzeno. Outras monoaminas são a serotonina (indolalquilamina), sintetizada a partir do aminoácido triptofano pela triptofano hidroxilase, e a histamina (imidazolamina), formada a partir da histidina pela histidina descarboxilase (KANDEL et al., 1995). Em invertebrados, as monoaminas atuam como neurotransmissores, neuromoduladores e até como neuro-hormônios. Entre elas, as catecolaminas são amplamente encontradas nos animais em geral, podendo ser sintetizadas por protozoários, planárias, nematodas, trematodas, celenterados, anelídeos, moluscos e artrópodes. A catecolamina mais importante entre os invertebrados é a dopamina, enquanto que a noradrenalina está geralmente ausente ou ocorre em pequenas quantidades (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989). No SNC de *M. abbreviatus*, corpos

celulares catecolaminérgicos foram identificados através do método do ácido glioxílico. Estas células catecolaminérgicas estão presentes em regiões dos gânglios cerebrais e dos gânglios pedais. Os grupamentos neuronais mostrando catecolaminas no gânglio cerebral desta espécie de caracol apresentou uma distribuição similar aos neurônios imunorreativos à dopamina e à tirosina hidroxilase de *Helix pomatia* o que, juntamente com o fato de que a dopamina é a catecolamina mais abundante no SNC de diversas espécies de gastrópodos, sugere que estes neurônios observados nos gânglios cerebrais de *M. abbreviatus* sejam dopaminérgicos. Nos gânglios pedais deste caracol, os neurônios catecolaminérgicos estão organizados em colunas localizadas lateralmente, estendendo-se desde a região dorso-medial até o nível da comissura principal do gânglio. Todos os neurônios catecolaminérgicos do SNC de *M. abbreviatus* são de pequena dimensão, e o neuropilo destes gânglios apresenta uma grande quantidade de fibras catecolaminérgicas, podendo significar um aporte de fibras catecolaminérgicas originadas de neurônios sensoriais periféricos (ZANCAN et al., 1997).

A octopamina recebeu esta denominação por ter sido primeiro detectada na glândula salivar de *Octopus*, e ocorre provavelmente em todos os filos, tendo um papel fisiológico importante em insetos como neurotransmissor (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989).

A serotonina (5-HT) é outro importante neurotransmissor nos filos de invertebrados, tanto no SNC como no periférico (SNP), atuando nas vias motoras interneural e sensorial (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989). Nos vertebrados, a serotonina é mais importante como neurotransmissor central, tendo uma ação periférica mais limitada. Em *M. abbreviatus* foram identificados diferentes grupos

neuronal e tratos de fibras imunorreativos à 5-HT nas diferentes porções do SNC. Técnicas de marcação fluorescente do ácido glioxílico (GA) e a injeção da neurotoxina 5,7-diidroxitriptamina (5,7-DTH) foram utilizadas para a localização de neurônios serotoninérgicos, revelando o maior número de células nos gânglios pedais, dentre os gânglios centrais (ZANCAN et al., 1997). A técnica de imunistoquímica comprovou a presença de um grande número de células 5HT-ir no gânglio pedal desta espécie de caracol (SWAROWSKY et al., 2005). No SNP de *M. abbreviatus* também foi encontrada imunoreatividade à 5-HT, especialmente do plexo pedioso do músculo do tarso. A imunoreatividade foi detectada nos ramos dos nervos pedais, nos gânglios e nas fibras do plexo pedioso em toda a extensão da musculatura pediosa, bem como na região associada ao integumento ventral. Na região subepitelial ventral encontrou-se uma arborização de fibras varicosas que se originam no plexo pedioso, terminando na região basal do epitélio, e às vezes alguns prolongamentos imunorreativos estendendo-se por entre estas células, alcançando a porção apical epitelial (FACCIONI-HEUSER et al., 2004). Estes dados, associados à presença dos neurônios 5HT-ir nos gânglios pedais do caracol, imunomarcados após o animal ser submetido a um estímulo térmico aversivo (SWAROWSKY et al., 2005), sugerem o envolvimento da 5-HT no circuito nociceptivo serotoninérgico.

Existem evidências que peptídios estejam envolvidos em vários aspectos relacionados a nocicepção, e conseqüentemente às respostas aos estímulos nocivos, tanto em invertebrados quanto vertebrados. Os peptídios podem atuar como neurotransmissores, sendo constituídos de moléculas grandes com cadeia linear de 5-40 aminoácidos, armazenados e liberados de vesículas sinápticas em terminais axonais (RANG et al., 1997). São classificados em famílias por possuírem seqüências de aminoácidos e ações semelhantes. Dentre estas famílias pode-se

destacar as taquicininas, secretinas, insulinas, gastrinas e opióides (JESSEL, et al. 1997).

Os peptídios pertencentes a família dos opióides (encefalinas, dinorfinas, opiocortinas) e a FMRFamida (KANDEL,2000) estão envolvidos na regulação de várias funções em moluscos, incluindo locomoção, transmissão sensorial tátil, ritmo respiratório, alimentação e nocicepção (ZANCAN,1996). O peptídeo FMRFamida (Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) foi descoberto inicialmente no gânglios do bivalve *Macrocallista nimbosa*, e desde então uma variedade de peptídios tem sido identificada em várias outras espécies. A FMRFamida tem sido implicada na atividade excitatória de tecidos e neurônios sensoriais em moluscos, e essa atividade parece estar associada a modulação sensorial, particularmente aquela associada a nocicepção (KAVALIERS, 1988a).

Neurônios e fibras imunorreativos à FMRFamida (FLI) foram detectados nos gânglios do SNC e no plexo pedioso do *M. abbreviatus*. As fibras imunorreativas foram identificadas no neuropilo dos gânglios, nas comissuras, nos conetivos e nos nervos. Nestes animais, a FMRFamida teria uma função relevante no processo modulatório e integrativo das funções motoras, tendo em vista as diversas formas de interação com os diferentes neurotransmissores presentes na musculatura pediosa, como foi observado com a 5-HT e a ACh. A presença de prolongamentos de somas positivos na porção subepitelial da musculatura pediosa pode sugerir uma função neurotransmissora, e as fibras imunomarcadas por toda a extensão da musculatura pediosa do *M. abbreviatus* poderia sugerir uma função neurosecretora periférica para o peptídeo FMRFamida. Assim, de um modo geral, os neurônios e as fibras FLI do plexo pedioso deste caracol podem estar envolvidos em circuitos motores, como

a locomoção, e em circuitos sensoriais, como a nocicepção (MORIGUCHI-JECKEL, 2001).

As encefalinas são peptídeos presentes também em diversos invertebrados, homólogos aos de mamíferos. Elas apresentam a capacidade de interagir com a liberação de outros neurotransmissores, como a dopamina e a substância P, o que indica o seu envolvimento na regulação de uma variedade de processos biológicos (SCHARRER, 1987). Os pentapeptídeos encefalinas, Met-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) e Leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) são expressos em sistemas neuronais totalmente separados a partir da proteína pró-opiomelanocortina (POMC), que origina, dentre vários produtos opióides e hormônios não-opióides, a pró-encefalina, da qual se originam a Met- e a Leu-encefalina. As características da estrutura primária das encefalinas de invertebrados e dos receptores opióides descritos nestes animais são similares às dos vertebrados, representando uma conservação deste sistema opióide ao longo da evolução (STEFANO, 1988). Os peptídeos opióides assumem nos vertebrados um importante papel no controle de vários processos comportamentais e fisiológicos que estão envolvidos na manutenção da homeostase do organismo (KAVALIERS, 1989). Sabe-se que estes peptídeos também estão envolvidos em uma ampla diversidade de funções nos moluscos, como termorregulação comportamental, locomoção, comportamento alimentar, nocicepção, transmissão sensorial tátil, ritmo respiratório e em atividades imunológicas. Tem-se evidenciado em moluscos a interação dos sistemas opióides endógenos com outros sistemas de neurotransmissão, porém, pouco se sabe sobre a base morfológica da neurotransmissão encefalinérgica e a distribuição destes neurônios no SN de moluscos gastrópodes. Em *M. abbreviatus*, neurônios imunorreativos à metionina-encefalina (MENk-ir) foram encontrados em todos os

gânglios nervosos centrais, sendo que a maior porção deles foi detectada nos gânglios visceral, parietal direito e pedais (ZANCAN, 1996). Estudos comportamentais eletrofisiológicos e farmacológicos realizados em moluscos (KAVALIERS, 1989; ROMERO et al., 1994; WALTERS, 1987; KAVALIERS & HIRST, 1986; ACHAVAL et al., 2005) têm evidenciado que os agonistas e antagonistas dos opiáceos exógenos e dos opióides endógenos têm ações similares àquelas induzidas nos mamíferos.

O envolvimento dos sistemas opióides em vários processos fisiológicos e comportamentais vem sendo evidenciado em inúmeros trabalhos, antes mesmo da obtenção de dados sobre a base morfológica da neurotransmissão encefalinérgica e localização dos neurônios contendo opióides no SN dos moluscos gastrópodes. Sabe-se que nos moluscos, mecanismos mediados por opióides endógenos podem deprimir a sensibilidade à dor (DYAKONOVA et al., 1995) e este efeito antinociceptivo pode ser revertido por um antagonista, o naloxone (ROMERO et al., 1994), o que também já foi demonstrado em *M. abbreviatus* (ACHAVAL et al., 2005). Sendo assim, muitos dos vários neurônios ME<sub>nk</sub>-ir encontrados nos gânglios centrais do *M. abbreviatus* podem estar envolvidos em funções modulatórias no amplo repertório comportamental aversivo, pelo qual os animais detectam e reagem aos estímulos nociceptivos.

Outro neuropeptídeo amplamente detectado em invertebrados é a substância P (SP), que faz parte da família das taquicininas ou neurocininas, cujos diferentes tipos de receptores participam na modulação da transmissão nociceptiva e antinociceptiva, e também nas respostas cardiovasculares (vasoativas) provocadas na medula espinhal de vertebrados (HELKE et al., 1990). No SN de moluscos gastrópodes, tem sido demonstrada imunoistoquimicamente a presença de SP

relacionada à de mamíferos. No *M. abbreviatus*, foram encontrados neurônios imunorreativos à SP (SP-ir) em quase todos os gânglios nervosos, sendo que o maior número destes foi detectada nos gânglios cerebrais (ZANCAN, 1996). No plexo pedioso deste caracol também foram encontrados neurônios SP-ir, bem como na região associada ao epitélio (plexo subepitelial). As fibras SP-ir dos nervos do plexo penetram nos gânglios, sendo que algumas delas o atravessam, emitindo projeções que rodeiam os somas neuronais, continuando-se em outro nervo. Axônios SP-ir emergem dos nervos, formando arranjos geométricos na região subepitelial (RIGON et al., 1998).

## 2- OBJETIVOS

Estudos prévios realizados em nosso laboratório em *M. abbreviatus* indicam a presença de neurônios catecolaminérgicos, peptidérgicos (SP, MEnK, FMRFamida) e serotoninérgicos no SNC deste animal, envolvidos com várias funções fisiológicas (ZANCAN, 1996; ZANCAN et al., 1997; MORIGUCHI-JECKEL, 2001; SWAROWSKY et al., 2005). Porém, nos invertebrados tem-se pouco conhecimento sobre os grupos de neurônios envolvidos nos circuitos nociceptivos. Assim, a utilização da proteína c-Fos como marcador da atividade neuronal permite identificar, após estimulação adequada, células ativadas dentro da via nociceptiva em qualquer lugar do sistema nervoso (BULLITT, 1990; ACHAVAL, 1991; HARRIS, 1998; PRADO & DAL BEL, 1998). Existem numerosas vantagens para utilizar a expressão de c-Fos em estudos da base neural da nocicepção, como a fácil identificação da localização precisa de populações neuronais que respondem a estímulos nocivos e o fato de que sua expressão pode ser analisada quantitativamente, simplesmente através da contagem de neurônios marcados por imunistoquímica (HARRIS, 1998).

Sabe-se que um dos maiores desafios da neurociências é a identificação funcional de neurônios envolvidos nos circuitos básicos de certos comportamentos, inclusive da nocicepção. Por existirem poucos estudos a respeito da expressão da proteína c-Fos no SNC de moluscos, o presente estudo procura determinar uma aproximação morfofuncional dos circuitos envolvidos na nocicepção, utilizando o modelo experimental estabelecido em nosso laboratório: o caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus*.

Sendo assim, os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Localizar mediante o procedimento imunistoquímico de anticorpo não marcado de Sternberger (1979), subpopulações neuronais c-Fos-ir no SNC de *M. abbreviatus* e estudar as prováveis variações desta proteína após estimulação térmica aversiva em diferentes tempos.
  
- Estudar semiquantitativamente as prováveis variações na expressão da imunorreatividade à c-Fos em animais controle e tratados, utilizando o procedimento de densitometria óptica.
  
- Observar os efeitos da morfina na expressão da proteína c-Fos no SNC de *M. abbreviatus*, quando administrada antes do estímulo térmico aversivo, através de análise imunistoquímica e de densidade óptica.

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

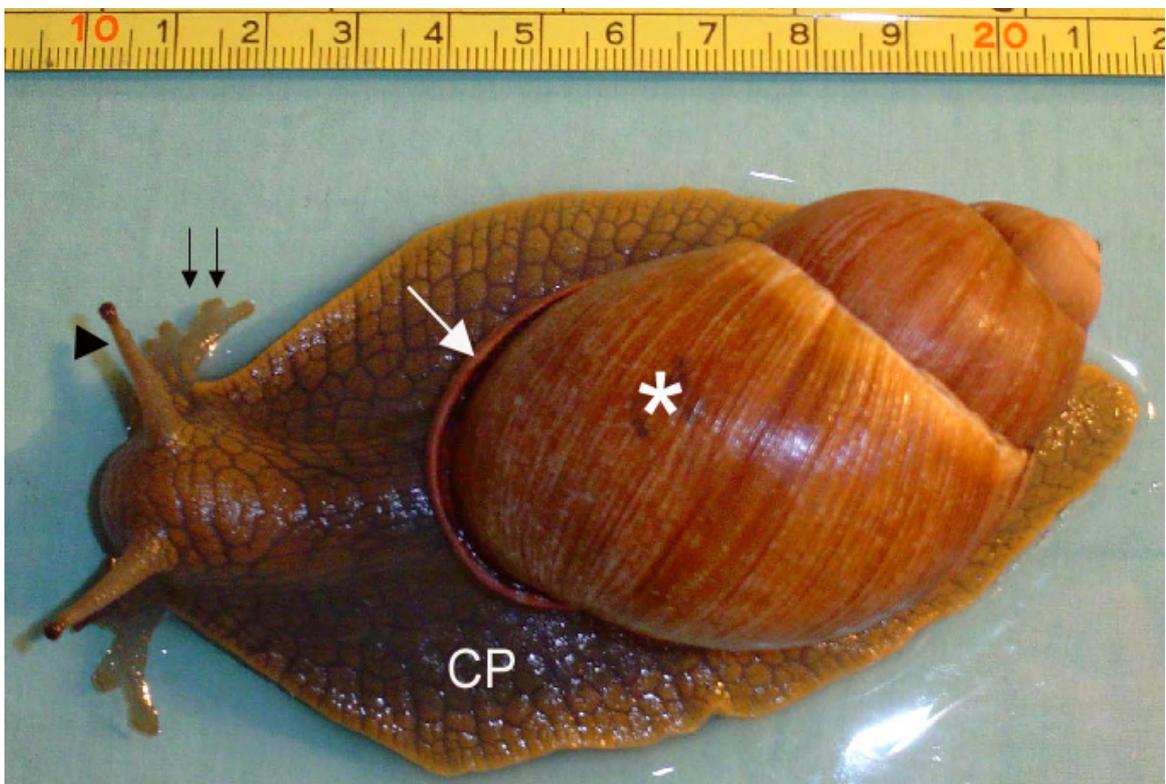
#### 3.1 – ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em 36 caracóis, *Megalobulimus abbreviatus* (BECQUAERT, 1948), previamente classificados como *M. oblongus* (THOMÉ *et al.*, 1994), coletados no município de Charqueadas (RS). Os animais foram mantidos em terrários telados no Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (UFRGS), sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodos naturais, alimentados com água e vegetais *ad libitum* (Fig 10).



**Figura 10** - Caracol da espécie *Megalobulimus abbreviatus* em condições de manutenção prévias ao experimento.

Foram utilizados para o experimento apenas animais adultos, caracterizados pela presença da borda da concha “virada”, de coloração rósea (Fig 11). O tamanho das conchas dos caracóis variou entre 53-79 mm de comprimento e 27-41 mm de largura e com uma faixa de peso de 41-78 g.



**Figura 11** – Animal adulto utilizado para experimentação. CP, complexo cabeça-pé; asterisco, concha; seta, borda virada de coloração rósea; cabeça de seta, tentáculos ópticos; seta dupla, palpos labiais.

## 3.2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 3.2.1 – EXPERIMENTO 1

Os caracóis foram divididos em 6 grupos de 6 caracóis, onde 5 grupos receberam um estímulo térmico aversivo de 50°C em uma placa quente (Socrel, modelo-DS37, Itália) (Fig 12), e foram sacrificados 3, 6, 12, 18 e 24 horas após o estímulo, e um grupo controle que não foi submetido ao estímulo térmico.



**Figura 12** – Modelo da placa quente utilizada para aplicação do estímulo térmico aversivo.

Para minimizar o estresse devido à novidade (KAVALIERS, 1987; 1988b), os caracóis foram hidratados em câmaras úmidas individuais, 2 h antes do experimento. Além disso, para evitar o provável efeito da falta de umidade no substrato durante a exposição dos caracóis na placa quente, um filme plástico coberto com 10 ml de água foi colocado sobre a placa. Esperava-se então, que a placa readquirisse a temperatura pré-determinada (PENHA, 2001). O limiar nociceptivo dos caracóis foi individualmente determinado por aferição da latência de seus comportamentos aversivo ou de retirada ao estímulo térmico (KAVALIERS & PERROT-SINAL, 1996). A aferição da latência iniciou-se no momento em que o caracol foi colocado na placa quente e terminou imediatamente após o animal elevar o complexo CP a, no mínimo, 1 cm da placa quente (ACHAVAL *et al.*, 2005; PENHA, 2001). A seguir, os caracóis foram rapidamente removidos da placa quente e devolvidos aos terrários até o momento do sacrifício dos mesmos. Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante o dia. Os animais foram estimulados em diferentes tempos para que todos pudessem ser sacrificados no mesmo período (11-14 h), para eliminar variáveis, pois os gastrópodos terrestres apresentam hábitos noturnos (CHASE, 2002).

### **3.2.2 – EXPERIMENTO 2: TRATAMENTO COM MORFINA**

Seis grupos de caracóis hidratados (3 em cada) foram injetados com sulfato de morfina (Cristália, Brasil) na concentração de 20 mg/kg, e outros 6 grupos de caracóis hidratados (3 em cada) foram injetado com salina (1 ml) na cavidade

hemocélica através da zona ventral anterior do pé. Após 15 min da injeção, os caracóis foram submetidos ao estímulo térmico, sendo colocado na superfície aquecida (50°C). Após o animal ter elevado o complexo CP a no mínimo 1 cm da placa quente, o caracol foi rapidamente removido da placa e devolvido para os terrários. Os animais que receberam injeção com salina ou morfina foram sacrificados em tempos diferentes após o estímulo térmico (3, 6, 12, 18 e 24 h). Outro grupo (controle; n=3) de caracóis hidratados não tratados também recebeu o estímulo aversivo.

### **3.3 – OBTENÇÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Os animais foram anestesiados em uma solução saturada de mentol (Synth, Brasil) por 30 min (ZANCAN *et al.*, 1997). Após a remoção da concha, o manto anterior e o diafragma foram seccionados, expondo a porção anterior do trato digestivo. Os gânglios cerebrais, situados dorsalmente ao bulbo bucal, foram retirados após a secção de nervos e conetivos que se localizam lateralmente e ântero-lateralmente a cada gânglio. Para a exposição dos gânglios subesofageais, o músculo retrator da rádula foi seccionado e o saco radular foi rebatido anteriormente. Após a secção de nervos e conetivos neurais, a massa ganglionar subesofageal foi retirada.

### 3.4 – FIXAÇÃO

Para a realização da técnica de imunistoquímica, todo o material removido foi fixado por imersão em paraformaldeído 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,1M pH 7,4, por 4 horas a temperatura ambiente. Após fixação, o material foi crioprotetido em solução de sacarose 15% e, logo após, em solução de sacarose 30%, diluídas em TF 0,1M, a 4 °C, sob contínua agitação, até os gânglios afundarem.

O processo de fixação deve preservar na melhor forma a capacidade antigênica das estruturas a demonstrar. Desta forma, ao aplicar o anticorpo, ocorrerá uma reação antígeno-anticorpo nos sítios que corresponderão a sua localização. Este procedimento é necessário para imobilizar os compostos teciduais solúveis (antígenos) em seu sítio de localização, manter a conformação geral dos tecidos e a capacidade antigênica dos mesmos. A perda de antigenicidade é influenciada por algumas variáveis que acompanham a solução fixadora. No caso do paraformaldeído, o número de pontes tipo metileno formadas depende não só da concentração do fixador, mas também da temperatura, pH e do tempo de exposição (RODRIGO *et al.*, 1996). O método de fixação mais amplamente aceito para a realização da imunistoquímica em microscopia óptica, por assegurar boa preservação do tecido e não destruir a antigenicidade das substâncias em estudo, envolve a utilização de solução de paraformaldeído diluído a 4% em TF 0,1M pH7,3-7,4 (revisão de LARSSON, 1983), a 4 °C durante o mínimo de tempo necessário, o que é também recomendado para tecidos nervosos de invertebrados (NÄSSEL & O'SHEA, 1987).

### **3.5 – SECÇÕES HISTOLÓGICAS**

Segundo ACHAVAL (1991), os métodos imunistoquímicos, em sua maioria, recomendam obter secções de blocos não-incluídos em parafina, uma vez que estes processos acarretam, supostamente, a perda de antigenicidade dos tecidos. Desta maneira, os gânglios nervosos centrais fixados e crioprotégidos foram orientados para cortes coronais (gânglios cerebrais) e horizontais – sentido dorso-ventral (complexo subesofageano), em pequenos blocos confeccionados em papel alumínio e preenchidos com meio de embebição (Tissue Tek, USA) para congelamento. Estes blocos foram rapidamente congelados em isopentano resfriado em nitrogênio líquido e colocados por aproximadamente 3 h a -20°C antes de serem realizadas as secções, para estabilizar a temperatura dos mesmos. Os tecidos foram seccionados a 50 µm em criostato (Leitz 1720 Digital) e coletados em tampão fosfato salino (PBS) para realizar o procedimento imunistoquímico dos cortes em “free-floating”.

### **3.6 – IMUNOISTOQUÍMICA**

#### **3.6.1 – TRATAMENTO PRÉVIO À INCUBAÇÃO COM O PRIMEIRO ANTICORPO**

O material seccionado no criostato foi coletado em frascos de vidro contendo PBS e lavados duas vezes com o mesmo tampão para a remoção completa do meio

de embebição. Para bloquear a atividade da peroxidase endógena, os cortes foram tratados com uma solução de metanol 10% diluída em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% preparada em água destilada, durante 30 min sob agitação constante e temperatura ambiente (SANTOS *et al.*, 2002).

Após a remoção da solução de peróxido de hidrogênio e metanol, os cortes foram lavados por duas vezes, durante 15 min cada, e pré-incubados por 30 min com soro normal de cabra (NGS) não imune a 3% preparada com Triton X-100 (Sigma) 0,4% diluído em PBS (PBS-Tx). A ação detergente do Triton favorece a penetração dos anticorpos através das membranas e a reação com o NGS é realizada para bloquear os sítios inespecíficos, prevenindo ligações não-específicas dos anticorpos com as proteínas básicas dos tecidos. Após este tratamento não é necessário realizar lavagens, bastando a drenagem do NGS e leve secagem antes da próxima etapa, que é a incubação com o primeiro anticorpo.

### **3.6.2 – APLICAÇÃO DO PRIMEIRO ANTICORPO**

Foi utilizado o anticorpo policlonal, desenvolvido em coelho contra a proteína c-Fos (Calbiochem), em uma diluição de 1:750 em PBS-Tx, durante 48 h a 4 °C, sob agitação constante. Logo após a incubação o material foi submetido a duas lavagens, de 15 min cada, em PBS.

### **3.6.3 – APLICAÇÃO DO SEGUNDO ANTICORPO**

O anticorpo secundário funciona como uma “ponte” necessária para fazer a ligação entre o anticorpo específico ligado e o complexo PAP (peroxidase anti-peroxidase). Este anticorpo utilizado, anti-IgG de coelho, desenvolvido em cabra (Sigma), foi diluído a 1:50 em PBS-Tx e utilizado para incubação dos cortes por 2 h, em temperatura ambiente. Após esta etapa de incubação, os cortes foram lavados em PBS (duas lavagens de 15 min cada).

### **3.6.4 – APLICAÇÃO DO TERCEIRO ANTICORPO OU COMPLEXO PAP**

Esta reação é realizada para ligar a enzima peroxidase, a qual é responsável pela reação final, à cadeia de anticorpos que deverão estar ligados ao antígeno em questão.

O complexo PAP (Sigma) foi diluído a 1:500 em PBS. Os cortes permaneceram incubando durante 1 h e 30 min. Novamente foram feitas duas lavagens de 15 min cada em PBS.

### **3.6.5 – REVELAÇÃO DA REAÇÃO PEROXIDASE**

Os cortes foram incubados em uma solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma) diluída a 0,06% em PBS, durante 10 min. Acrescentou-se, em seguida, peróxido de hidrogênio 10% na quantidade de 1µl/ml de solução de DAB, durante 10 min a temperatura ambiente e agitação constante. A reação produziu um precipitado marrom. Após, os cortes foram cuidadosamente lavados em PBS.

### **3.6.6 – MONTAGEM DOS CORTES**

Os cortes foram coletados em lâminas previamente gelatinizadas com gelatina-cromo alúmen. Após a secagem, foram desidratados com soluções de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e montadas com Permount e lamínulas.

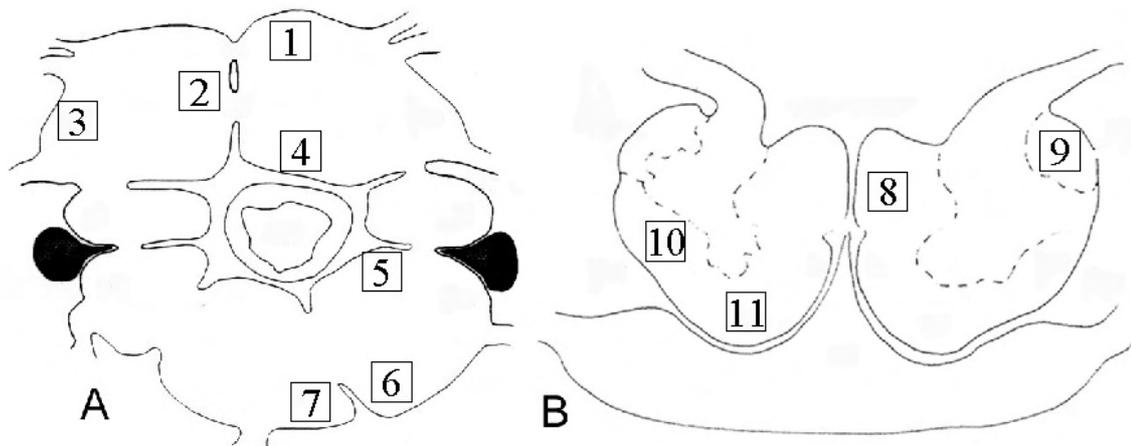
### **3.6.7 – CONTROLE DA ESPECIFICIDADE DA IMUNORREAÇÃO**

Foi feito este experimento para o controle da técnica imunoistoquímica. Para tanto, o anticorpo primário foi omitido do meio de incubação, sendo substituído por

PBS, e o restante do procedimento foi realizado da mesma forma descrita anteriormente.

### **3.7 – DENSIDADE ÓPTICA**

A imunorreatividade à proteína c-Fos foi avaliada nos experimentos 1 e 2 usando densitometria óptica regional através de análise independente entre eles, uma vez que foram realizados em dias diferentes, não sendo assim permitida a comparação (GONZALES-LIMA & GARROSA, 1991; HEVNER *et al.*, 1995; PARTATA *et al.*, 2002; RASIA-FILHO *et al.*, 2002; FERRAZ *et al.*, 2003; SWAROWSKY *et al.*, 2005). Para medir a imunorreação da proteína c-Fos, um microscópio Nikon-Eclipse E-600 (Japão) acoplado ao Software Image Pro-Plus 4.1 (media Cybernetics, USA) foi utilizado. Imagens digitalizadas das secções foram obtidas usando uma câmara CCD (Pro-Series High Performance). As imagens coloridas foram digitalizadas e convertidas em uma escala de cinzas (8 bits - 256 níveis de cinza) nas regiões analisadas, e uma caixa de amostragem de 44.100  $\mu\text{m}^2$  (AOI – área de interesse) foi colocada sobre os grupos neuronais anteriores, mediais, posteriores e laterais dos gânglios pedais; sobre os grupos neuronais anteriores e posteriores ao neuropilo do gânglio parietal direito; sobre os neurônios c-Fos-ir isolados do gânglio visceral; e sobre os neurônios do mesocérebro, dos lobos pedal e pleural do pós-cérebro e sobre os neurônios do pró-cérebro dos gânglios cerebrais (Fig. 13).



**Figura 13** – Representação esquemática dos gânglios do SNC de *M. abbreviatus* analisados e as regiões cujas medidas de densidade óptica foram adquiridas. **A:** complexo subesofageano; 1, neurônios anteriores do gânglio pedal; 2, neurônios mediais do gânglio pedal; 3, neurônios laterais do gânglio pedal; 4, neurônios posteriores do gânglio pedal; 5, neurônios anteriores ao neuropilo do gânglio parietal direito; 6, neurônios posteriores ao neuropilo do gânglio parietal direito; 7, neurônios do gânglio visceral. **B:** gânglios cerebrais; 8, mesocérebro; 9, pró-cérebro; 10, lobo pedal do pós-cérebro; 11, lobo pleural do pós-cérebro.

Todas as condições de luz e magnificações foram mantidas constantes entre as secções e áreas, e adicionalmente o investigador não foi informado dos grupos experimentais cujas secções analisadas foram obtidas. Além disso, para realizar a densitometria, foi necessário que todo o procedimento imunohistoquímico de cada experimento fosse realizado com todos os grupos ao mesmo tempo, para eliminar variáveis.

A densidade óptica foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$DO(x,y) = -\log [(INTENSIDADE (x,y) - \text{preto}) / (\text{Incidência} - \text{preto})]$$

**Onde:** **DO**= densidade óptica; **(x,y)**= coordenadas de pixel analisado; **Intensidade**= intensidade de luz visível no pixel; **Preto**= intensidade gerada quando a luz não atravessa o material; **Incidência**= é a intensidade da luz incidente

Os resultados obtidos representam a média de densitometria óptica de todos os pixels nas áreas selecionadas (GONZÁLEZ-LIMA & GARROSA, 1991; HEVNER *et al.*, 1995; PARTATA *et al.*, 1999; FERRAZ *et al.*, 2003; SWAROWSKY *et al.*, 2005).

### **3.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As medidas de densidade óptica (DO) coletadas das regiões anteriormente mencionadas foram comparadas entre os diferentes grupos animais, em diferentes tempos de sobrevivência após o estímulo térmico aversivo, usando a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni ( $p < 0,05$ ), no software SPSS 9.0.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO

Quando submetidos ao estímulo térmico a 50°C os caracóis apresentaram um comportamento aversivo bifásico. Na primeira fase, logo que colocados na superfície aquecida, os animais exibiram uma extensão do pé, o qual foi imediatamente retraído lateralmente. Ao mesmo tempo, os tentáculos orais e os palpos labiais retraíram-se, e este movimento foi seguido por uma retração medial-ventral do complexo CP, iniciando-se na região rostral e estendendo-se à região caudal. Desta maneira, apenas a porção lateral do pé permaneceu em contato com o substrato, com a ocorrência de uma retração parcial do corpo para dentro da concha, de maneira que, quando observado de frente, o complexo CP mostrou um aspecto triangular (Fig. 1-A). Em uma segunda fase, os tentáculos orais e os palpos labiais que encontravam-se retraídos começaram a protrair-se, e o caracol passou a realizar movimentos de procura sobre a placa, seguidos de ondas parapodiais características de comportamentos exploratórios. Subseqüentemente, os animais exibiram uma elevação do complexo CP a 1cm ou mais do substrato (Fig. 1-B).

Os animais que não receberam a injeção de nenhum veículo durante o experimento (controle), apresentaram uma média na latência da resposta aversiva de 25,1 s ( $\pm$  7,9), apresentando uma intensa secreção de muco, o qual mostrou-se amarelado. Os caracóis que receberam a injeção de solução salina (1 ml) apresentaram uma média na latência da resposta aversiva de 26,2 s ( $\pm$  5,5) e um

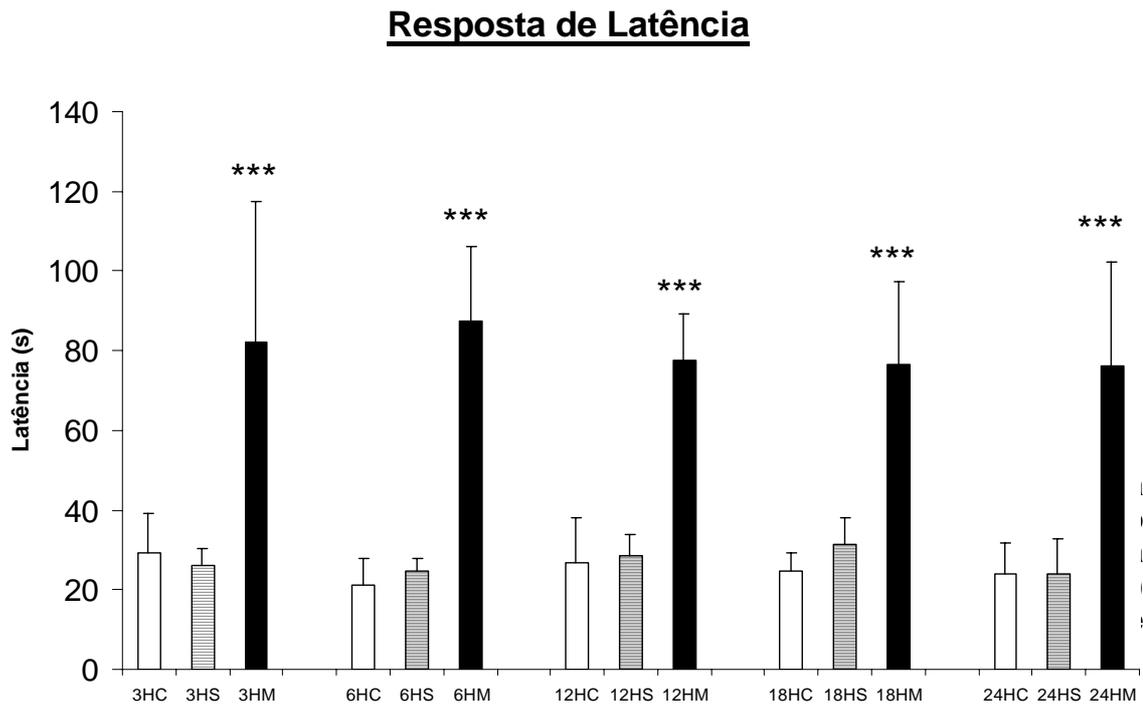
comportamento similar ao do grupo controle, não havendo uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos controle e salina na latência da resposta aversiva dos caracóis (Fig. 14).

Após 15 min da administração de morfina (20 mg/kg) e antes de serem colocados na placa quente os caracóis mostraram uma rigidez muscular. Os tentáculos ópticos e orais destes caracóis permaneceram protraídos e flácidos em todas as fases do teste. Quando colocados na placa quente, estes animais apresentaram uma retração parcial do complexo CP, menos intensa do que aquela observada nos animais controle e salina. Na segunda fase do comportamento aversivo, os caracóis mostraram uma protração parcial dos palpos e dos tentáculos orais, os quais continuaram flácidos. Todos os animais deste grupo, pré-tratados com morfina antes do estímulo térmico aversivo, apresentaram secreção de um muco espesso e amarelado. Com esta administração de morfina, a latência da resposta aversiva foi significativamente maior (média de 79,9 s,  $\pm 10$  s) do que as obtidas para os grupos controle e salina (Fig. 14).

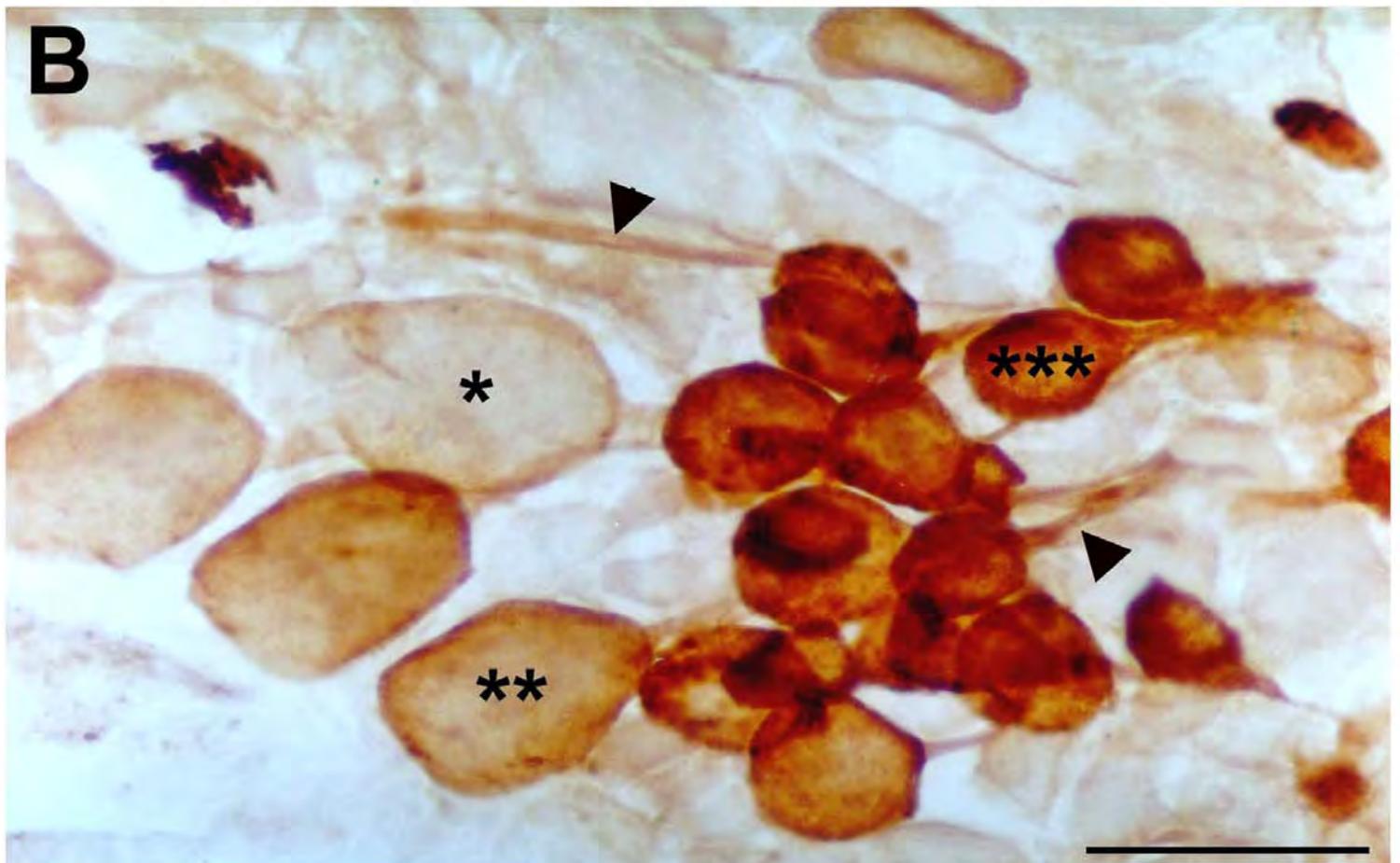
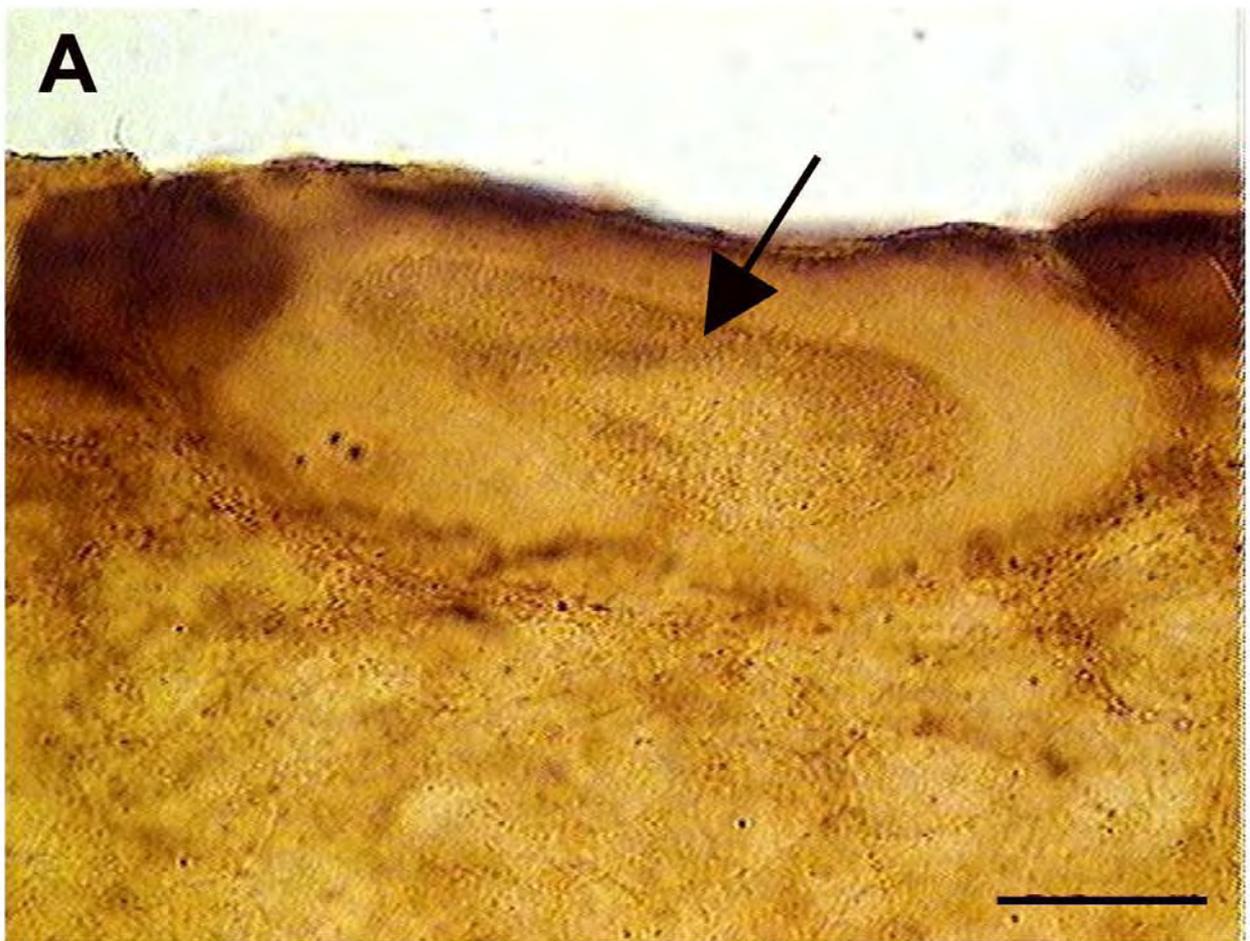
#### **4.2 – IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA c-FOS**

A imunorreatividade para a proteína c-Fos foi observada no citoplasma (Fig. 15 B) e no núcleo (Fig. 15 A) dos neurônios estimulados, os quais apresentaram grânulos de cor parda, intensamente corados. As células não expressaram a imunorreatividade para a proteína c-Fos da mesma forma, variando o tipo de intensidade (fraca, intermediária e forte) de coloração em todos os gânglios

analisados (Fig. 15 B). Esta variabilidade foi encontrada comparando-se diferentes áreas de um mesmo gânglio e até mesmo em diferentes células presentes em uma mesma zona. Na determinação da especificidade da reação, onde foi omitido o anticorpo primário e o material foi incubado com PBS, os resultados foram negativos, com nenhuma marcação existente (Fig. 16), indicando que a imunorreatividade observada (Fig. 16 B) não se deve aos anticorpos secundários e terciários, e sim ao anticorpo primário. Também identificou-se a presença de axônios imunorreativos (Fig. 15 B) em diferentes regiões, partindo de neurônios em direção ao neuropilo dos gânglios correspondentes. A intensidade dos axônios marcados, quando observada, também apresentou variações (de fraca a forte), sendo que, quando bem imunorreativos, as suas ramificações também puderam ser visualizadas.

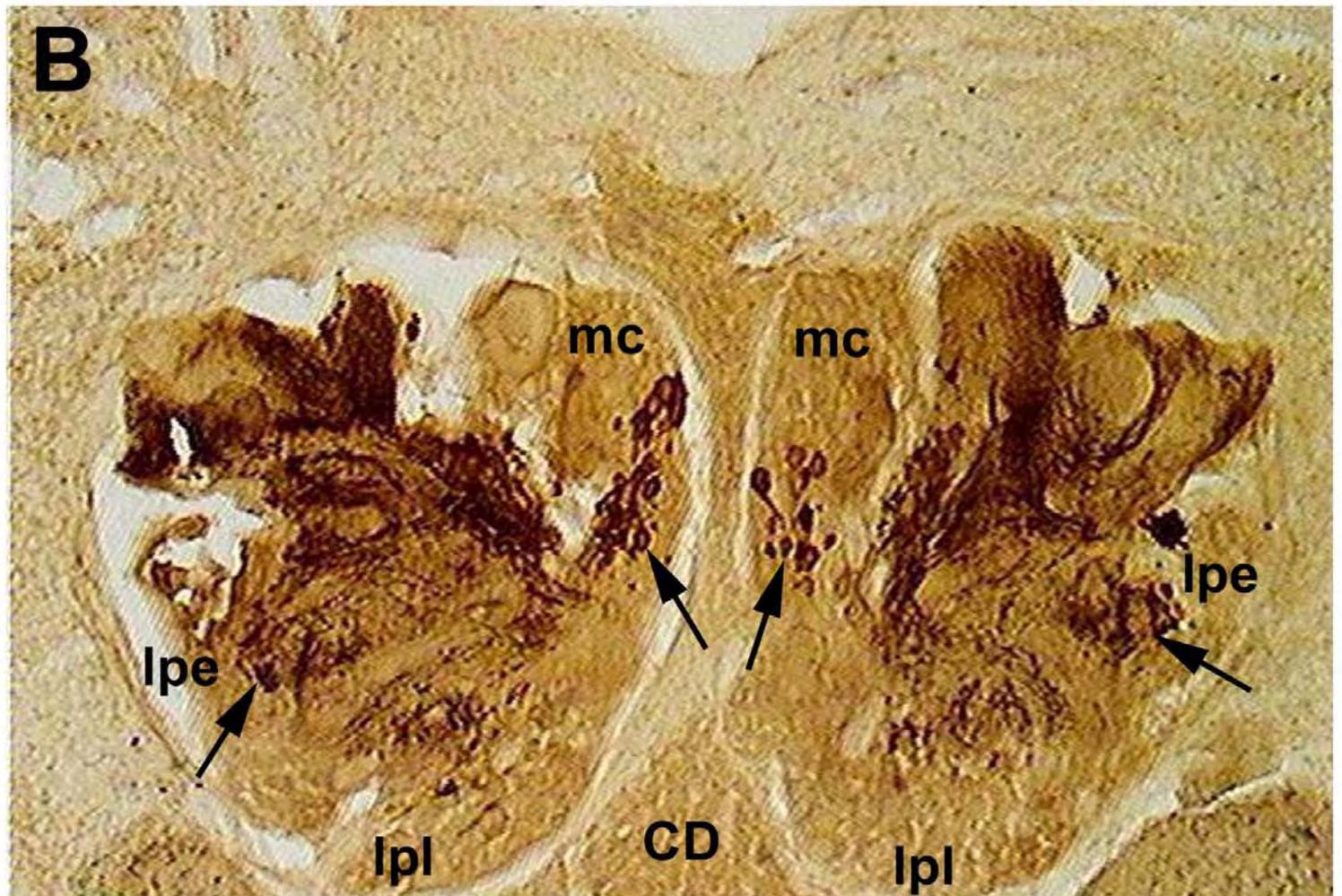
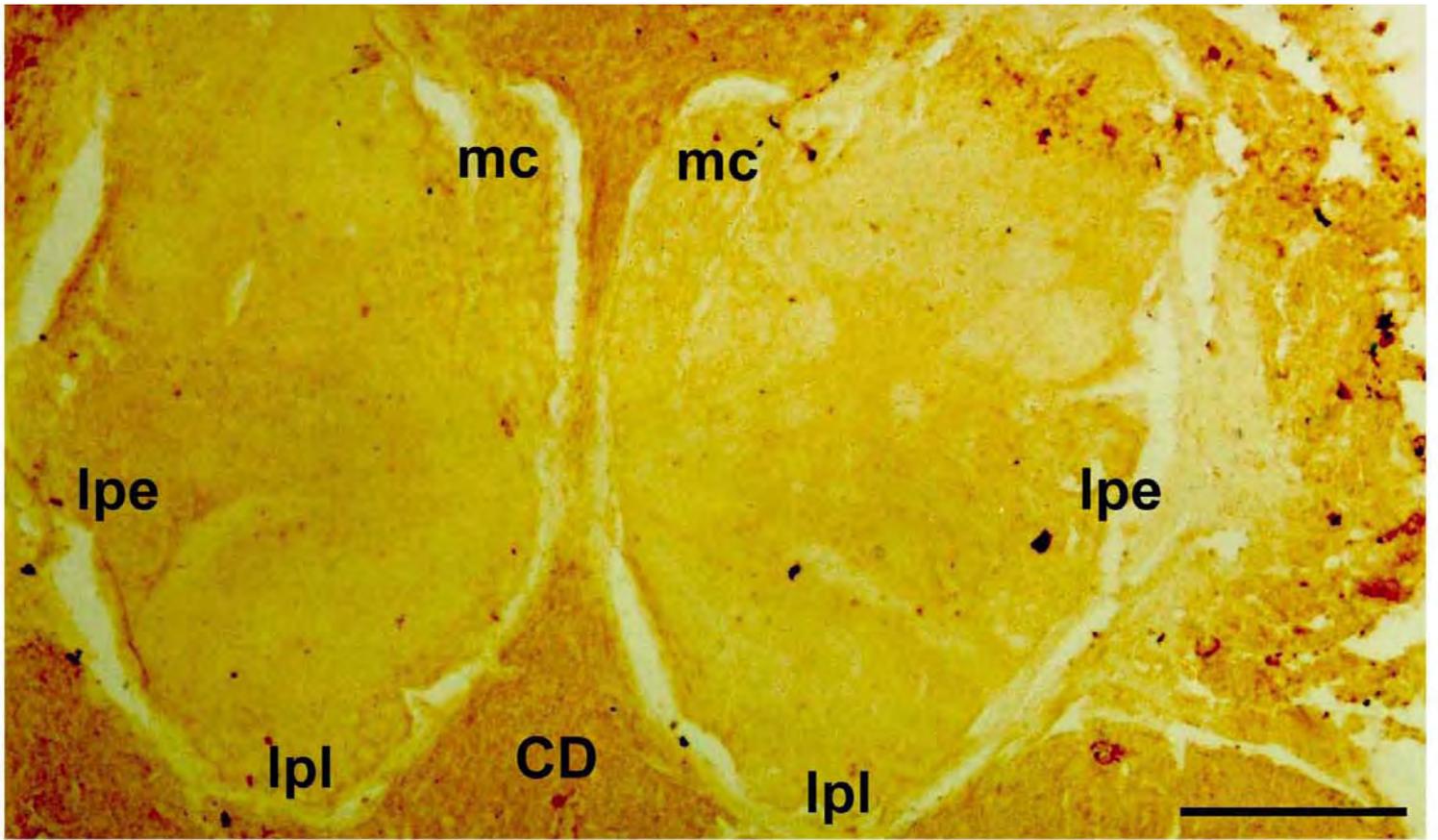


**Figura 14** – Efeito do tratamento com salina (1,0 ml) ou morfina (20 mg/kg) na latência da resposta aversiva após o estímulo térmico (50°C) 15 min após a injeção em animais sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). Observar a diferença extremamente significativa entre o grupo tratado com morfina (M) ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle (C) e ao grupo salina (S). (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Bonferroni).



**Figura 15 - A:** Fotomicrografia de neurônio medial de tamanho grande do gânglio pedal de animal sacrificado 6 h após o estímulo térmico aversivo mostrando núcleo imunorreativo (seta). Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

**B:** Fotomicrografia representativa da intensidade da imunorreação citoplasmática em diferentes neurônios da região do mesocérebro do gânglio cerebral de animal sacrificado 6 h após o estímulo térmico aversivo; intensidade fraca, um asterisco; intensidade média, dois asteriscos; intensidade forte, três asteriscos; prolongamento axonal imunorreativo, cabeça de seta. Barra: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 16** – Fotomicrografia de secções dorsais do gânglio cerebral mostrando a reação imunoistoquímica.

**A:** Secção do gânglio incubada apenas com PBS, onde foi omitido o anticorpo primário.

**B:** Secção do gânglio processada para o procedimento de imunoistoquímica, mostrando neurônios Fos-ir (seta).

CD, corpo dorsal; lpl, lobo pleural do pós-cérebro; lpe, lobo pedal do pós-cérebro; mc, mesocérebro.

Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.1 – GRUPO CONTROLE**

Para descrever a distribuição dos neurônios Fos-ir no SNC do caracol *M. abbreviatus*, os gânglios cerebrais e o complexo subesofageano foram observados em três áreas horizontais representativas: dorsal, medial e ventral.

Nos animais do grupo controle, que não foram submetidos ao estímulo térmico aversivo, neurônios Fos-ir foram encontrados em vários gânglios do SNC do caracol (Fig. 17).

##### **4.2.1.1 – GÂNGLIOS CEREBRAIS**

Nos gânglios cerebrais, corpos neuronais imunorreativos à c-Fos foram observados no mesocérebro em secções ao nível da comissura cerebral (Fig. 18), bem como em regiões dorsais e ventrais à mesma. Em secções dorsais, poucos neurônios Fos-ir (aproximadamente 8 células) de tamanho médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foram detectados na região do mesocérebro, e além destas células, um grupo de aproximadamente 40 neurônios pequenos (10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foi identificado junto ao neuropilo (Fig. 19). Estes neurônios pareciam estar dispostos em uma coluna que se estende até a região medial do gânglio, aparecendo também em cortes mediais. Ainda neste plano de secção, neurônios imunorreativos foram encontrados no pró-cérebro, perfazendo um total de aproximadamente 10 células pequenas (< 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro), distribuídas de forma aleatória (Fig. 20). Também

no lobo pedal do pós-cérebro foram identificados alguns neurônios Fos-ir (10-15 células) com dimensões variando de média a pequena. Um grupo neuronal, de aproximadamente 20 células de tamanho pequeno (10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro), intensamente marcado, foi identificado nesta região do pós-cérebro, próximo ao neuropilo, podendo ser observado um denso feixe de fibras partindo destes neurônios em direção ao neuropilo (Fig. 20). Em secções mediais do gânglio cerebral, um grupo celular de aproximadamente 20 neurônios de tamanho médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foi identificado anterior ao neuropilo do mesocérebro, organizados em um arranjo semelhante a um “cacho de uvas” (Fig. 18). Neste mesmo nível de secção, no lobo pleural do pós-cérebro, poucos neurônios Fos-ir, em posição posterior ao neuropilo, foram detectadas aproximadamente 10 células de tamanho médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) (Fig. 21).

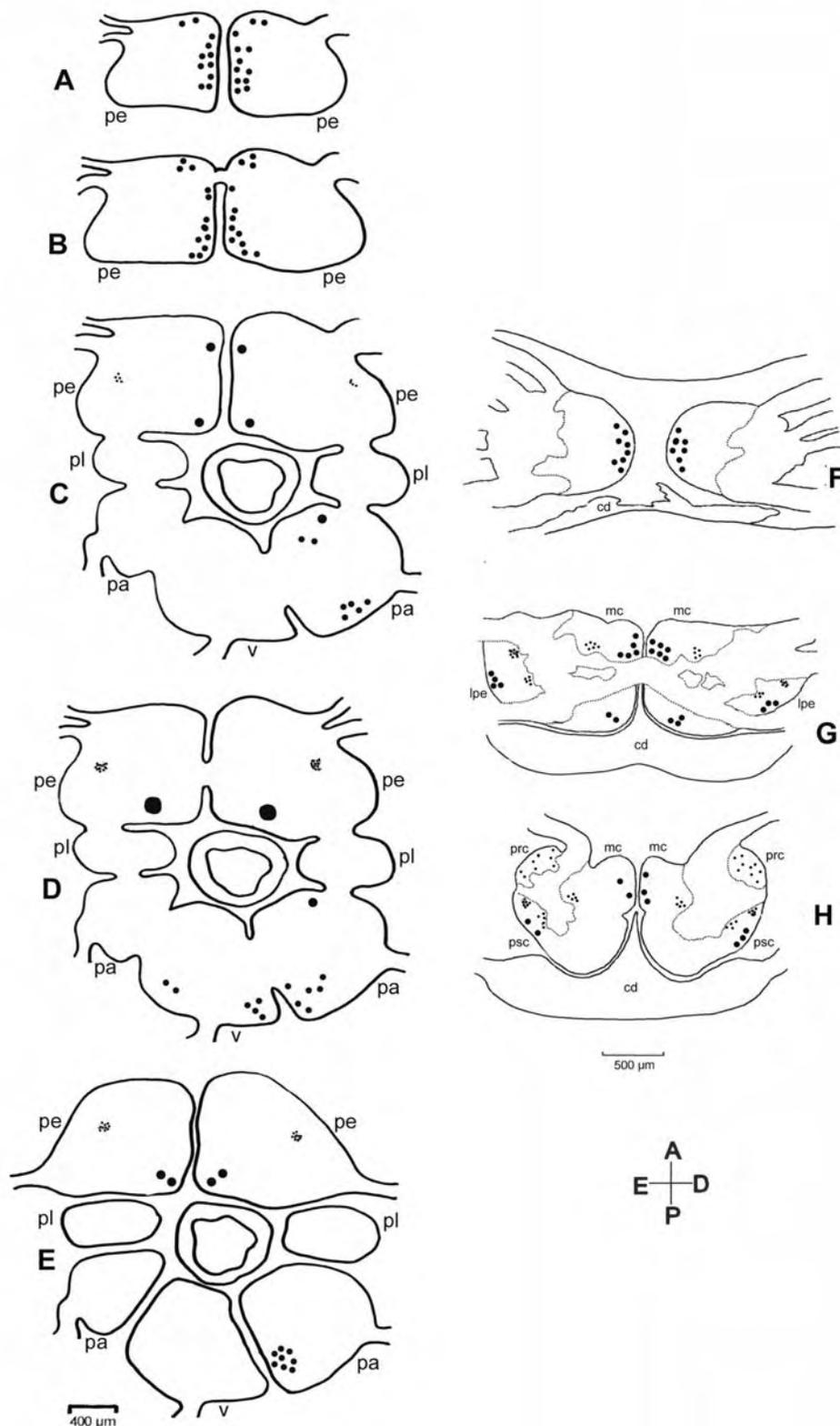
#### **4.2.1.2 – COMPLEXO SUBESOAGEANO**

Na descrição da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios pedais considerou-se quatro localizações neuronais: anterior, medial, posterior (SWAROWSKY *et al.*, 2005) e lateral (Fig. 22). Neurônios imunorreativos foram encontrados principalmente nas regiões mediais e posterior de secções ventrais dos gânglios, perfazendo um total de aproximadamente 30 células de tamanho médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) (Fig. 23). Nos outros níveis de secção (medial e dorsal), observou-se um grupo de 15 neurônios pequenos (10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro) intensamente imunorreativos localizados lateralmente ao neuropilo (neurônios

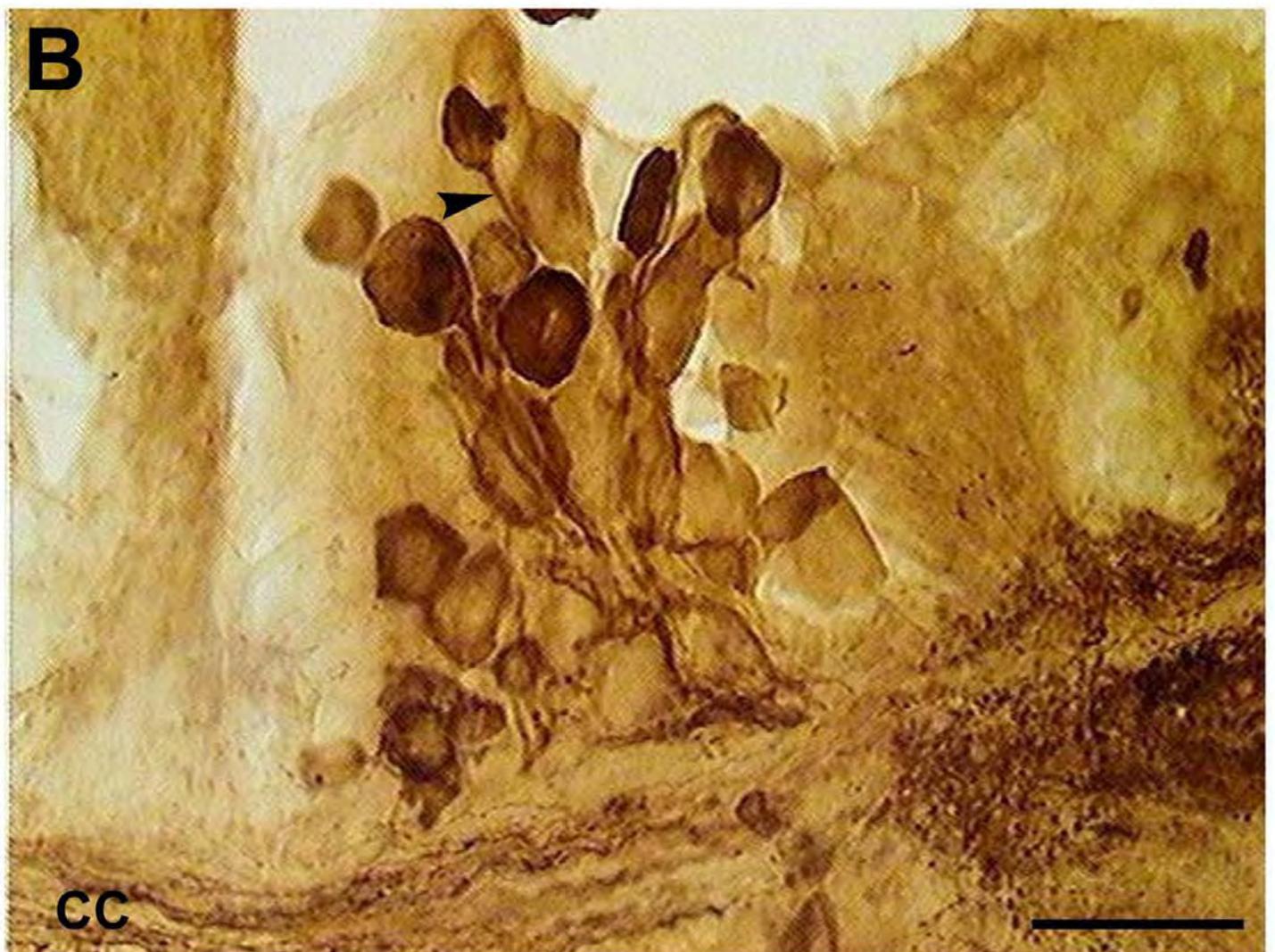
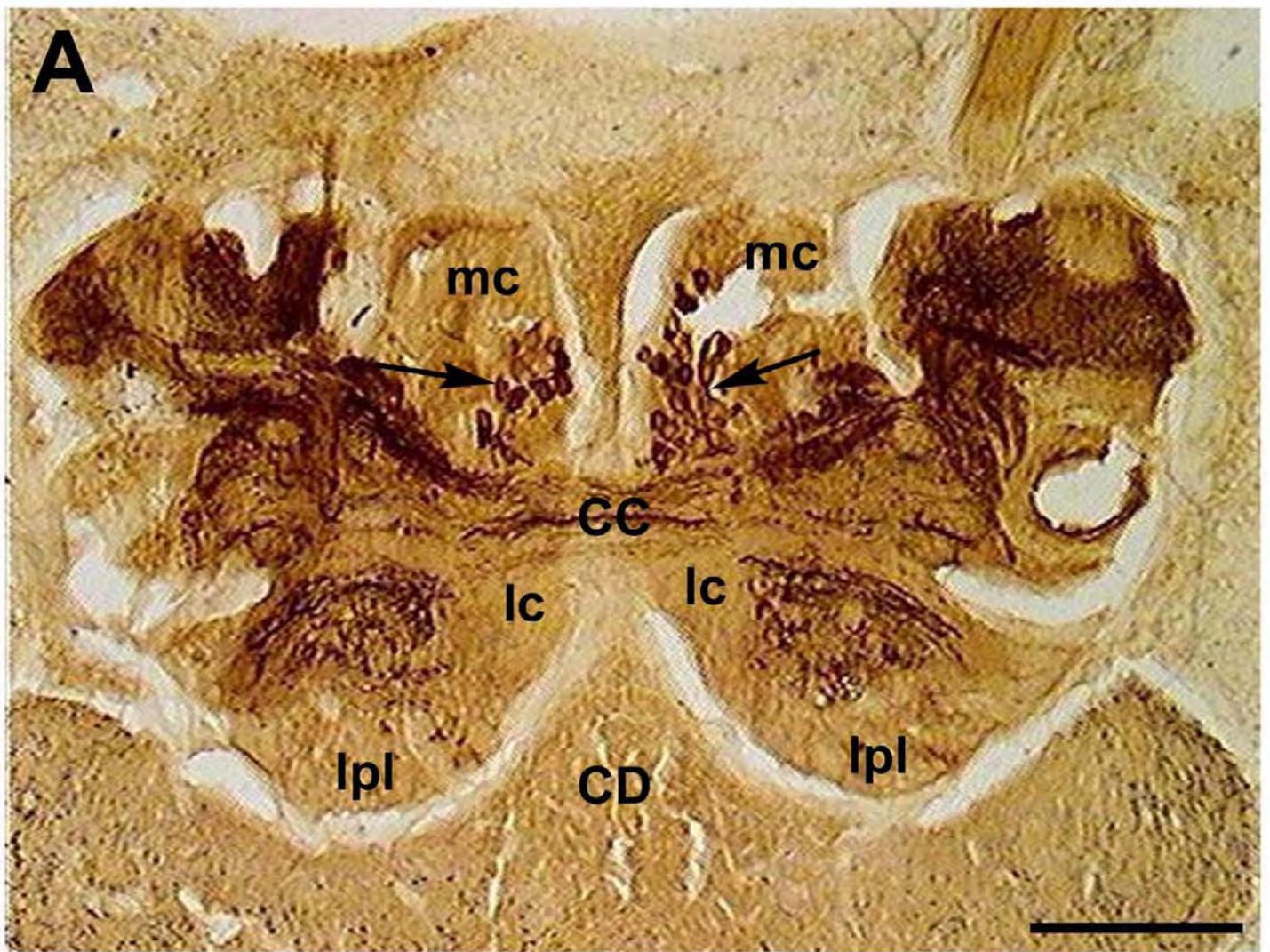
laterais), podendo-se identificar fibras partindo destas células em direção ao neuropilo (Fig. 24). Tais neurônios parecem estar dispostos em uma coluna, estendendo-se desde a porção dorsomedial até o nível da comissura pedal principal. Em secções mediais, ao nível da comissura pedal principal, apenas um par de neurônios gigantes (180-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foi identificado na região posterior do gânglio (Fig. 25).

No gânglio parietal direito identificou-se um grupo de aproximadamente 15 neurônios Fos-ir médios (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) localizados nos planos ventromedial, medial e dorsal do gânglio e neurônios grandes (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro), posicionado posteriormente ao neuropilo e próximos ao limite com o gânglio visceral (Fig. 26 A e C; Fig. 27 A) e ao limite posterior do próprio gânglio. Ainda neste nível de secção, um neurônio grande (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) Fos-ir foi identificado localizado anteriormente ao neuropilo do gânglio, próximo ao limite com o gânglio pleural direito, podendo ser identificado claramente seu prolongamento axonal em direção ao neuropilo (Fig. 26 B).

O gânglio visceral também apresentou neurônios Fos-ir em uma localização posterior ao neuropilo, próximo ao limite posterior do gânglio e principalmente no limite com o gânglio parietal direito. Os neurônios encontrados apresentaram tamanhos médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e grande (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) em secções mediais, perfazendo um total de aproximadamente 8 células imunorreativas (Fig. 27 B).



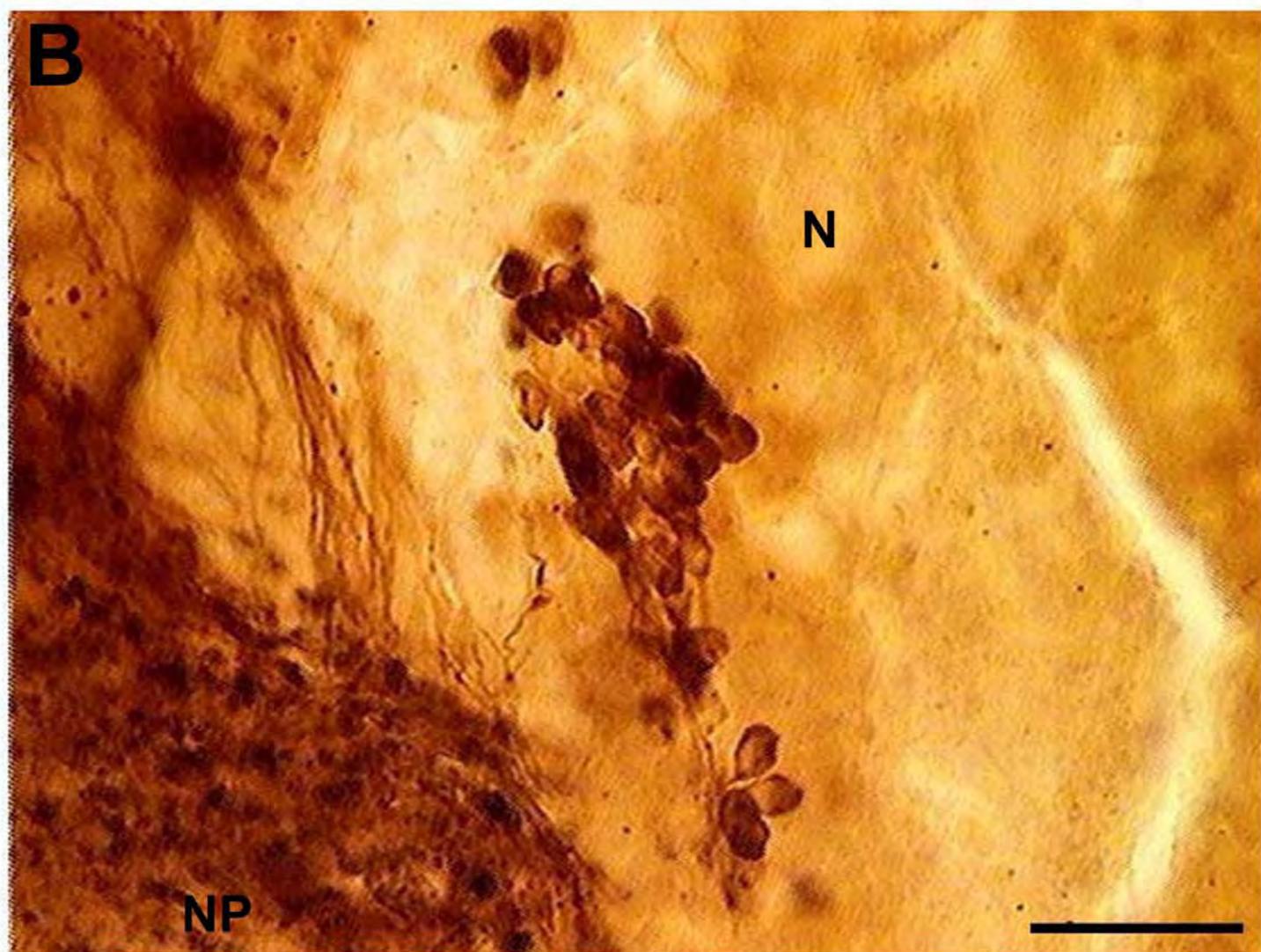
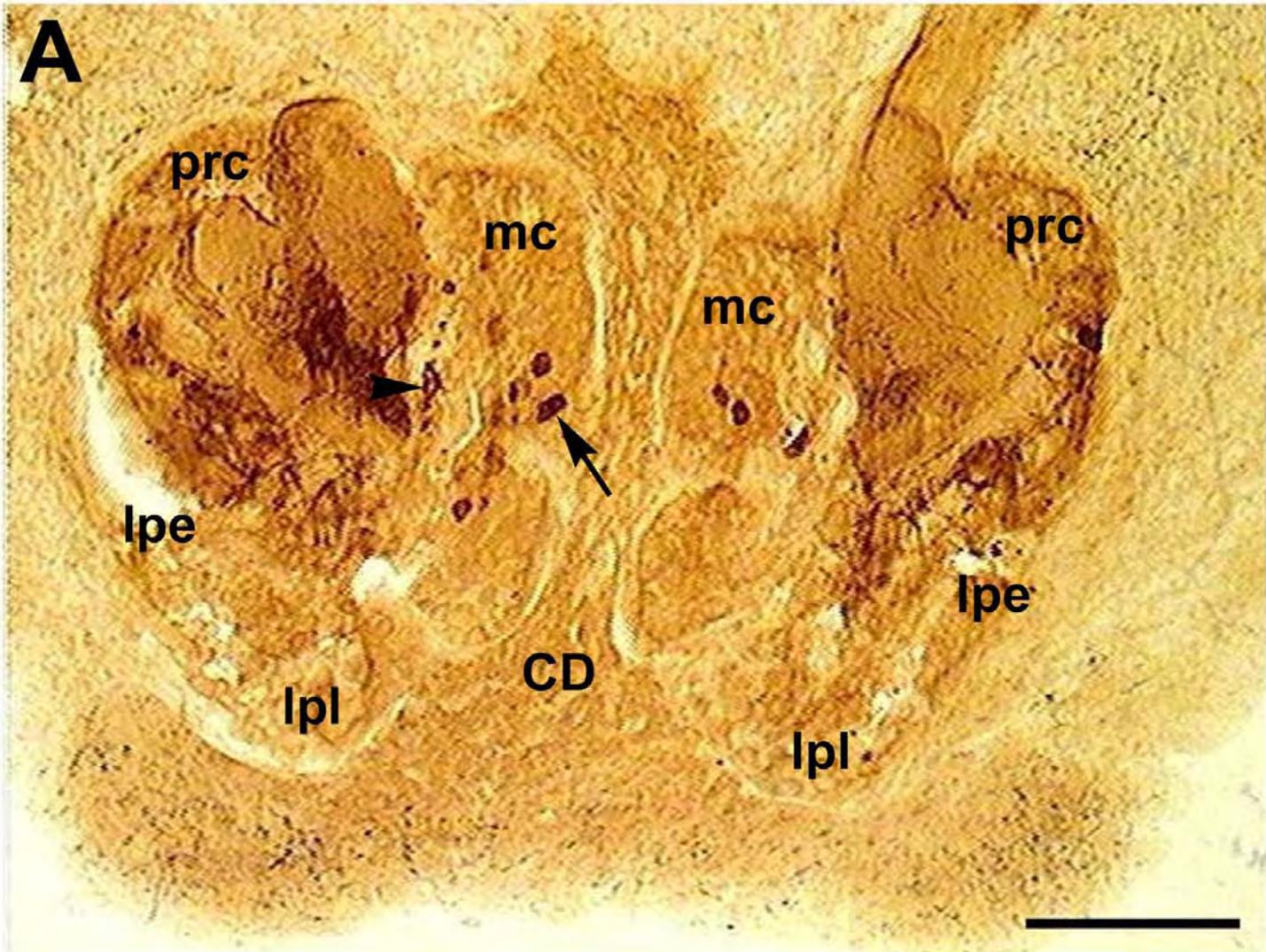
**Figura 17** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus* em animais controle. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio pleural; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro; lpe, lobo pedal. Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).



**Figura 18** – Fotomicrografia de cortes horizontais de gânglios cerebrais.

**A:** Corte ao nível da comissura cerebral (cc), mostrando o mesocérebro (mc), lobo comissural do pós-cérebro (lc), lobo pleural dos pós cérebro (lpl), corpo dorsal (CD). Neurônios Fos-ir estão presentes no mesocérebro em arranjo semelhante a um “cachos de uva” (seta). Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

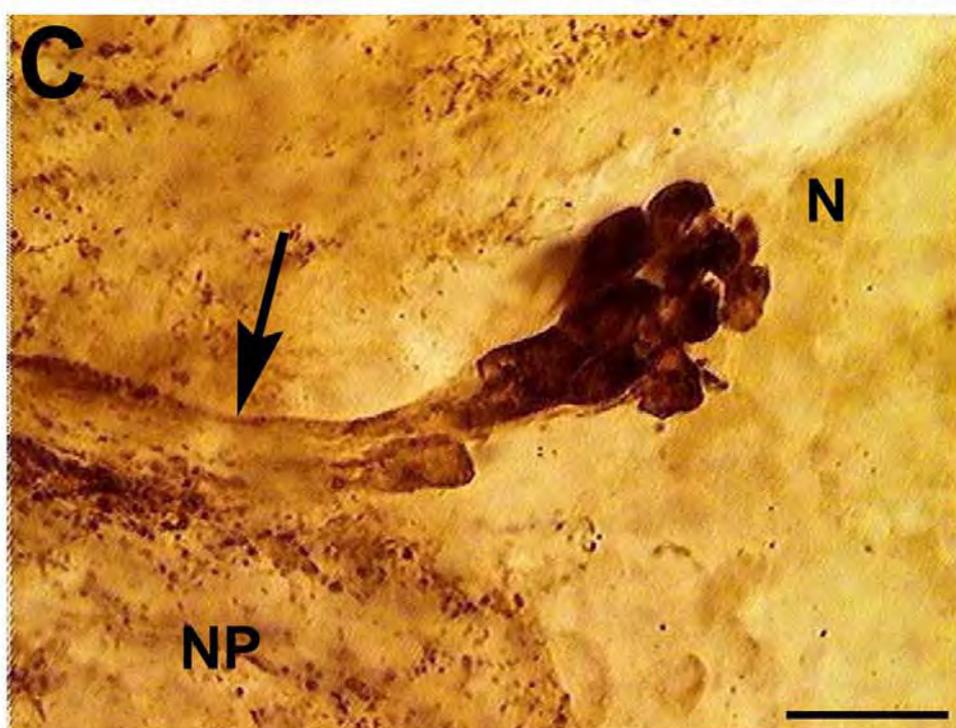
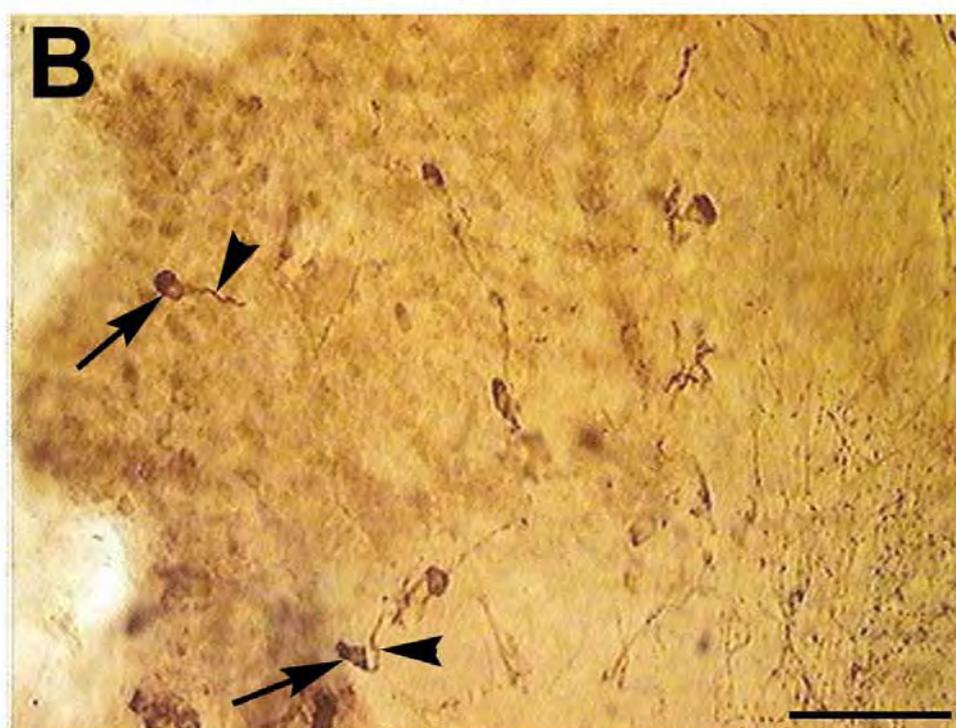
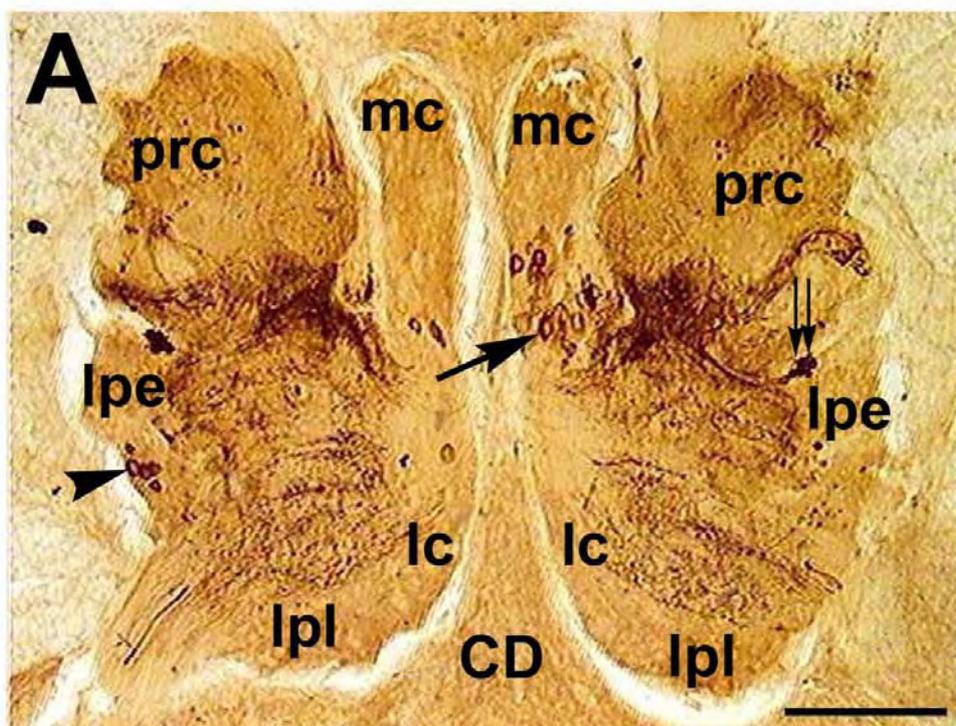
**B:** Detalhe do mesocérebro mostrando os neurônios Fos-ir de tamanho médio presentes nesta região. Pode-se notar também a imunorreatividade dos axônios de alguns neurônios (cabeça de seta) em direção ao neuropilo do gânglio. Barra: 80  $\mu\text{m}$ .



**Figura 19** – Fotomicrografia de corte horizontal dos gânglios cerebrais

**A:** Corte no plano dorsal mostrando o mesocérebro (mc), o pró-cérebro (prc), os lobos pedal (lpe) e pleural (lpl) do pós-cérebro, e o corpo dorsal (CD). Notar a presença de poucos neurônios Fos-ir neste plano de secção (seta) no mesocérebro e um grupo de neurônios pequenos (cabeça de seta) na mesma região do gânglio. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhe dos neurônios Fos-ir de tamanho pequeno localizados no mesocérebro do gânglio cerebral, junto ao neuropilo (NP), ao lado de neurônios imunonegativos de tamanho médio (N). Barra: 40  $\mu\text{m}$ .

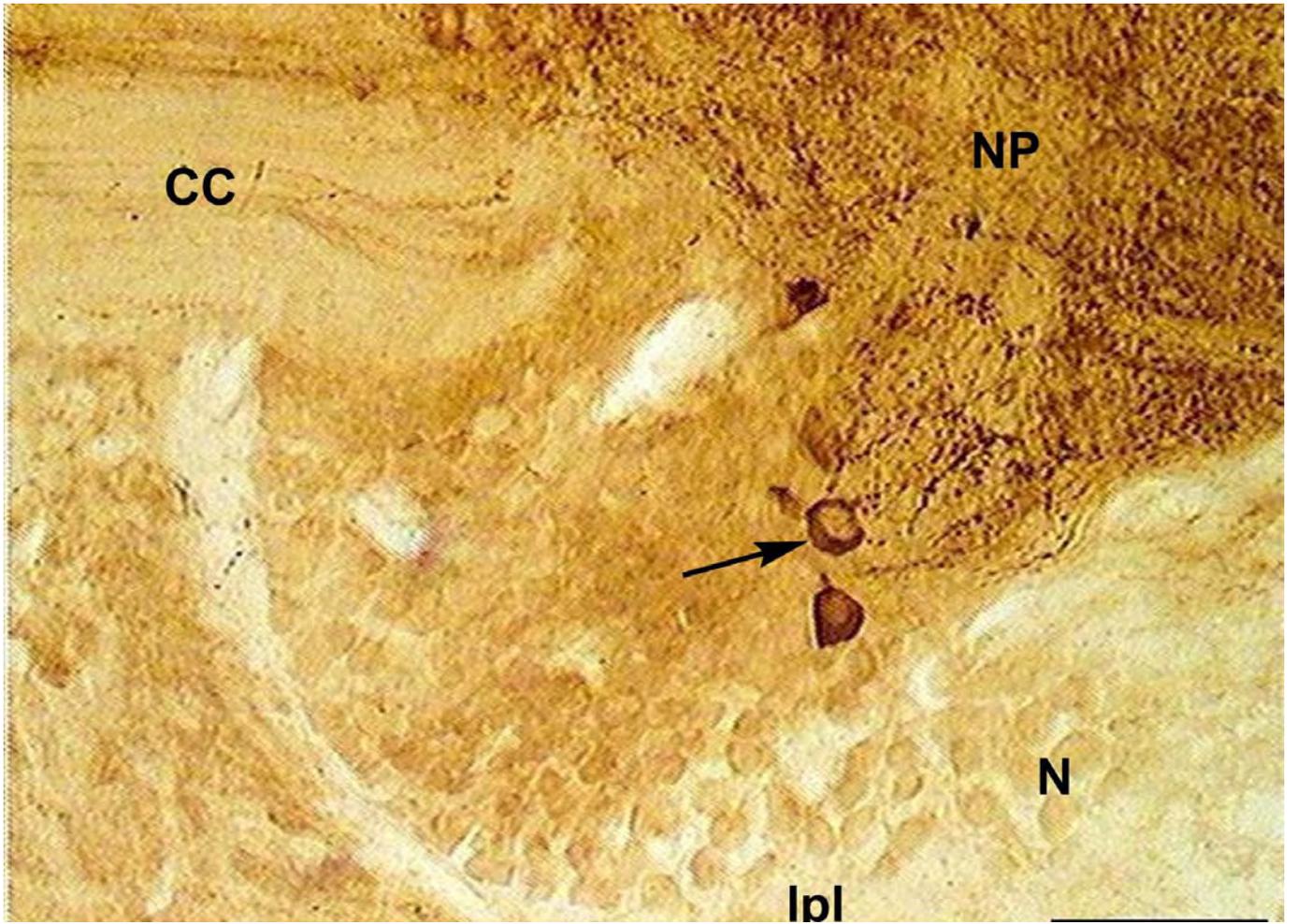


**Figura 20** - Fotomicrografia de corte horizontal dos gânglios cerebrais.

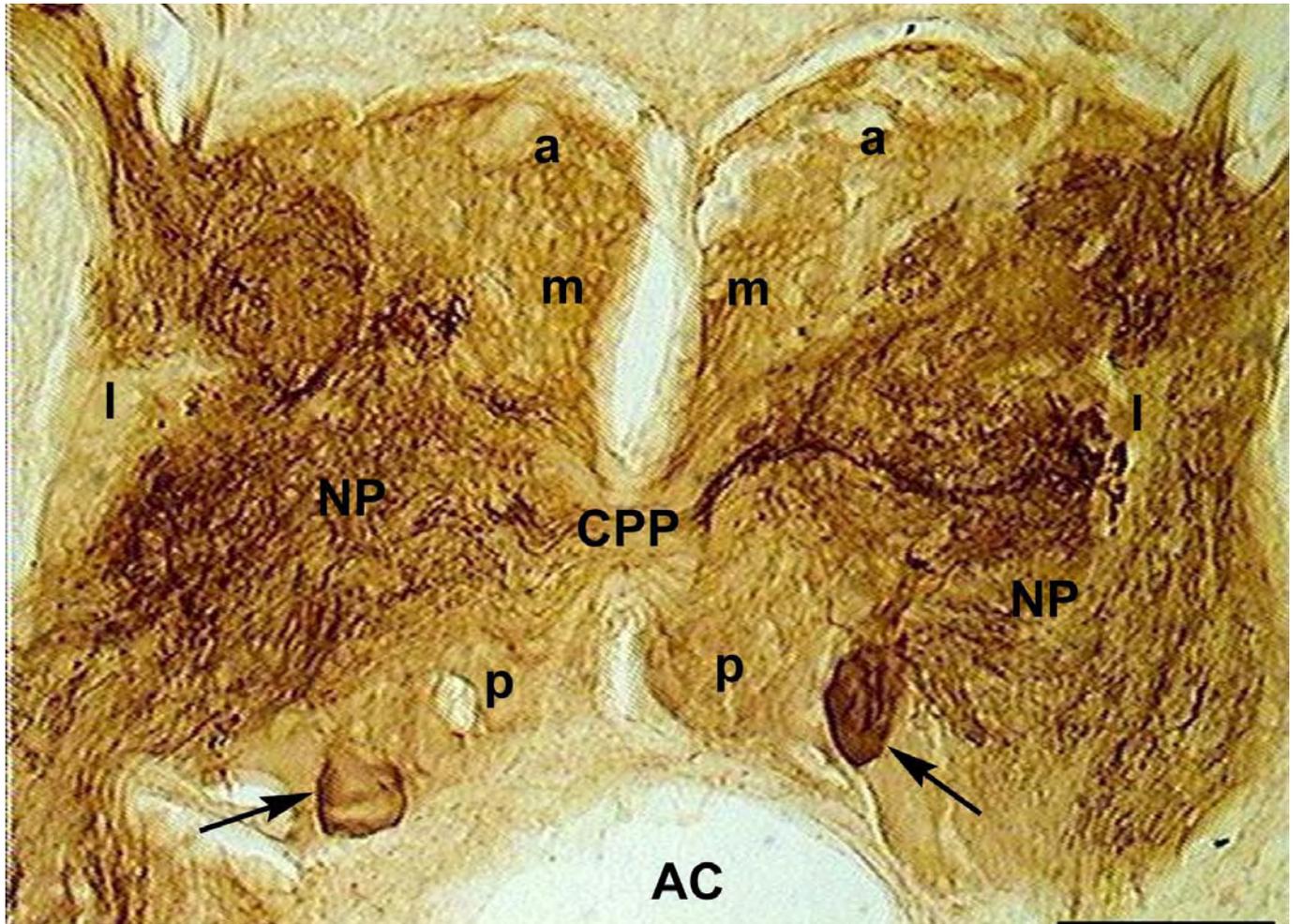
**A:** Secção no plano dorsal dos gânglios cerebrais mostrando o mesocérebro (mc), com neurônios Fos-ir de tamanho médio (seta); pró-cérebro (prc) com neurônios pequenos imunorreativos; os lobos comissural (lc) e pleural (lpl) sem neurônios Fos-ir; o lobo pedal (lpe) com neurônios imunorreativos de tamanho médio (cabeça de seta) e de tamanho pequeno (seta dupla); CD, corpo dorsal. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhe do pró-cérebro do gânglio cerebral mostrando neurônios pequenos imunorreativos à c-Fos (seta), podendo ser identificados seus prolongamentos axonais também imunorreativos (cabeça de seta). Barra: 80  $\mu\text{m}$ .

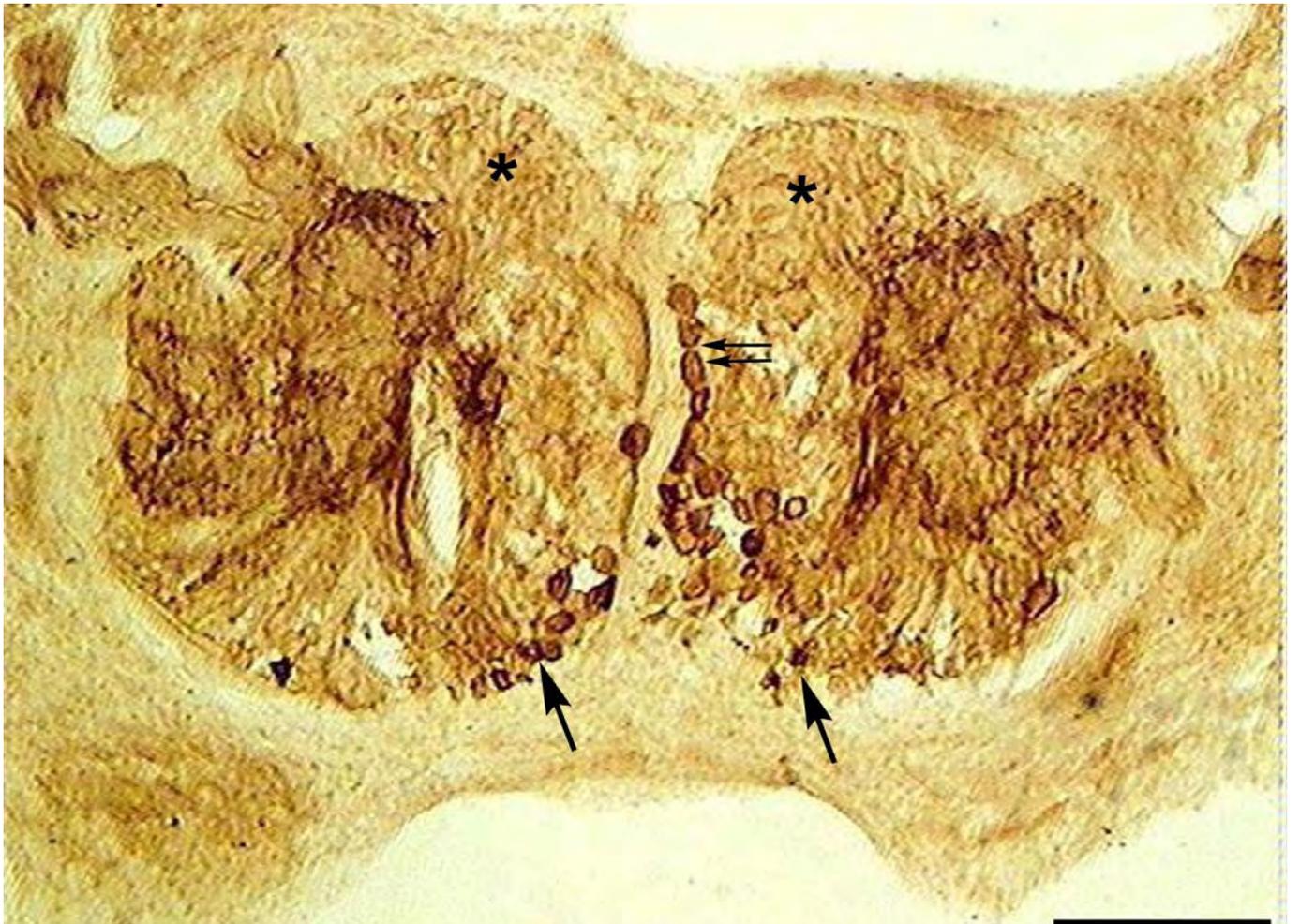
**C:** Detalhe do lobo pedal do pós-cérebro mostrando um denso agrupamento de neurônios intensamente imunorreativos, com prolongamentos axonais também bastante imunorreativos (seta) em direção ao neuropilo do gânglio (NP). Neurônios negativos (N). Barra: 40  $\mu\text{m}$ .



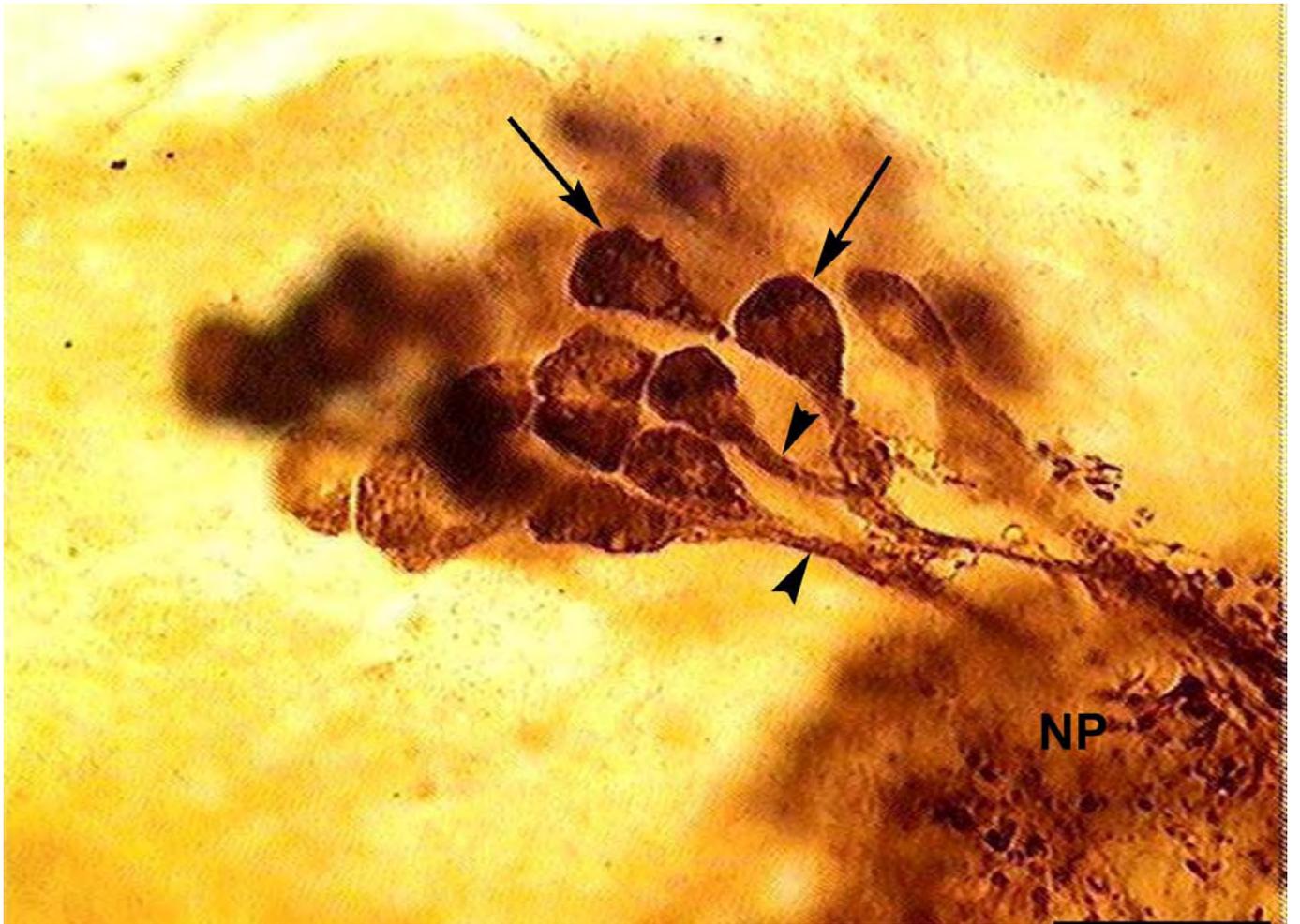
**Figura 21** - Fotomicrografia de secção do hemigânglio cerebral direito ao nível da comissura cerebral (CC), mostrando o lobo pleural do pós-cérebro (lpl) com poucos neurônios Fos-ir de tamanho médio (seta) próximos ao neuropilo (NP) e neurônios imunonegativos (N). Barra: 160  $\mu$  m.



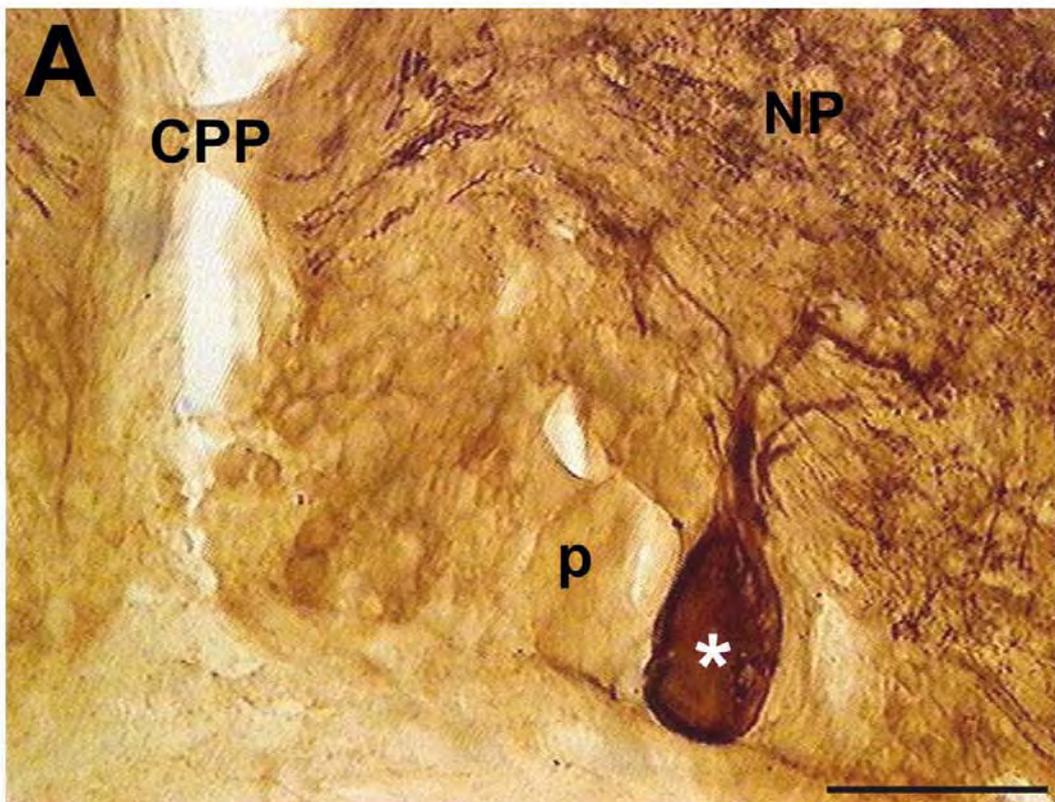
**Figura 22** – Fotomicrografia de secção horizontal medial dos gânglios pedais mostrando os grupos neuronais analisados. Neurônios anteriores (a), neurônios mediais (m), neurônios posteriores (p) e neurônios laterais (l). CPP, comissura pedal principal; NP, neuropilo; AC artéria cefálica. Observar a presença de um par de neurônios gigantes (seta) na região posterior dos gânglios. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .



**Figura 23** – Fotomicrografia de secção horizontal ventral dos gânglios pedais mostrando neurônios mediais (seta dupla) e neurônios posteriores (seta) Fos-ir. Na região anterior (asterisco) não aparecem neurônios imunorreativos nesta secção. Barra: 400  $\mu$ m.

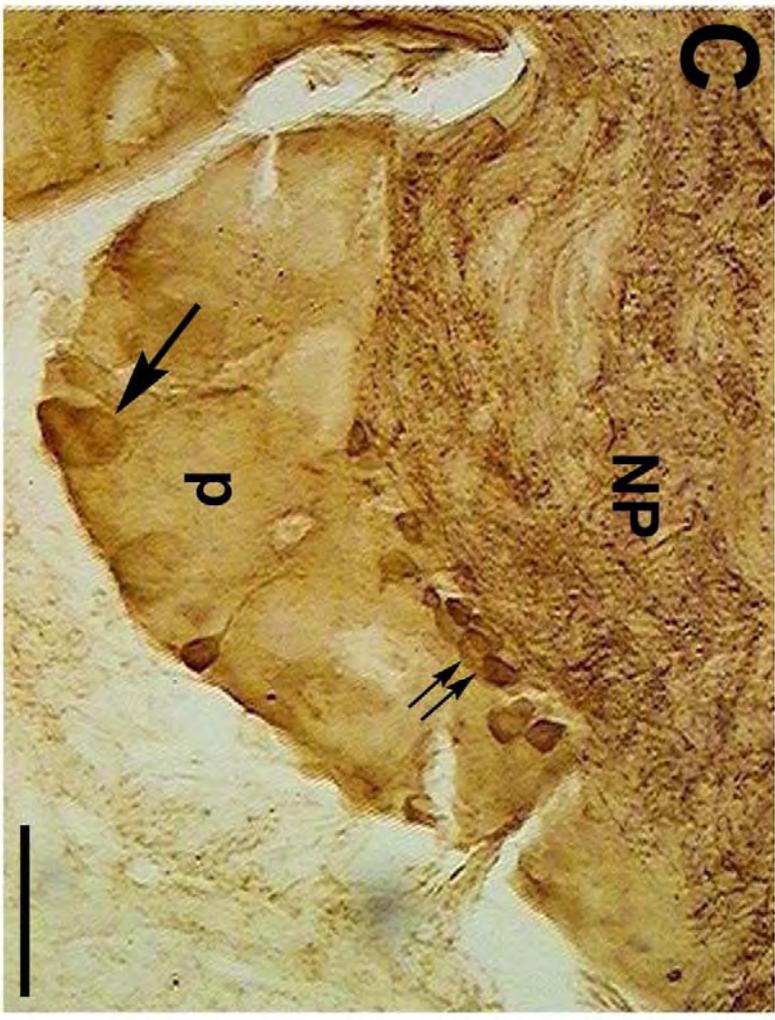
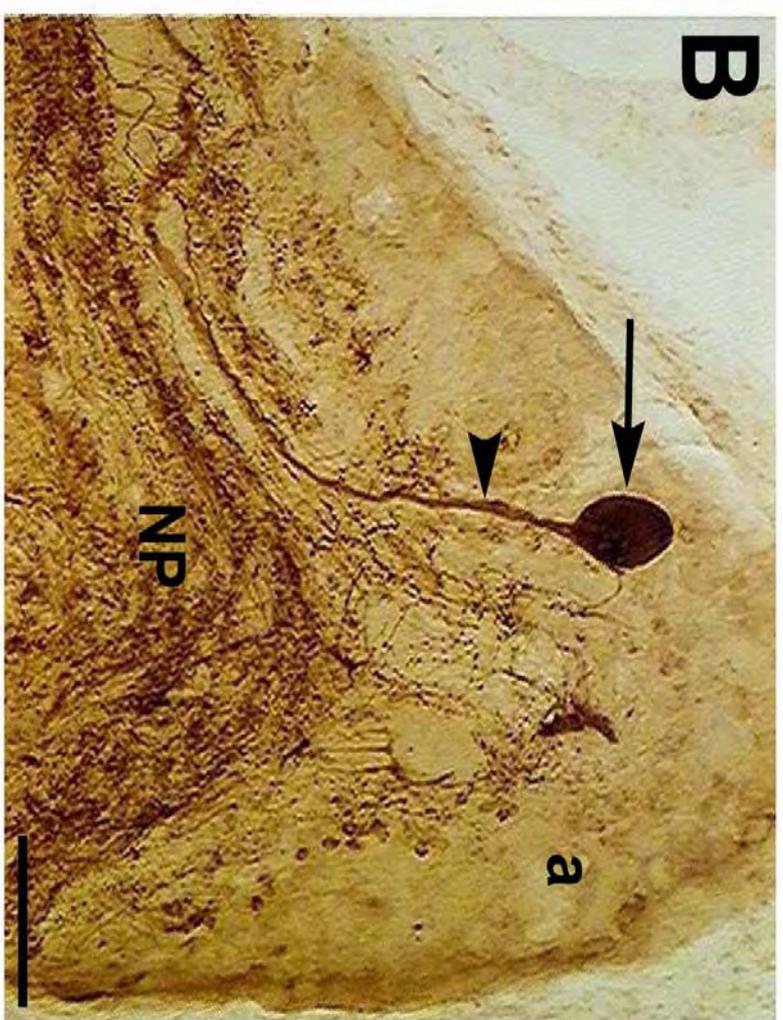
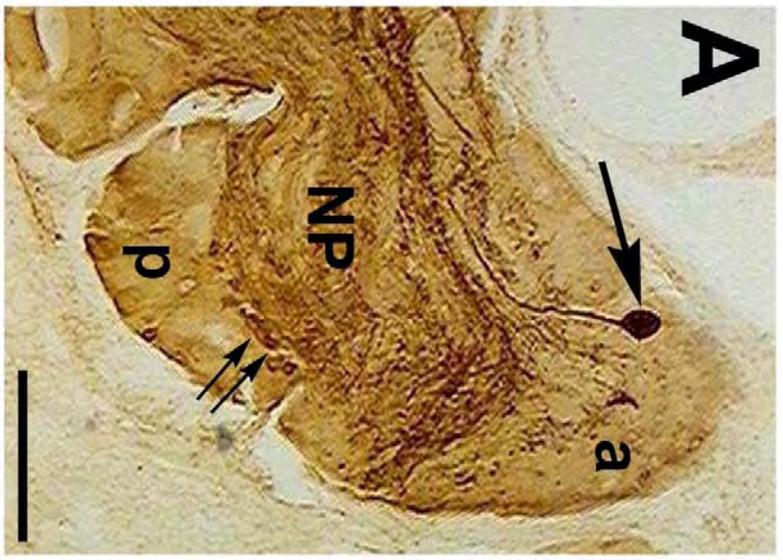


**Figura 24** – Fotomicrografia de grupo de neurônios laterais intensamente imunorreativos (seta) com axônios também fortemente marcados (cabeça de seta) em direção do neuropilo (NP). Barra: 400  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25 – A:** Fotomicrografia de secção horizontal medial do hemigânglio pedal direito mostrando a comissura pedal principal (CPP) e na região do grupamento de neurônios posteriores (p) a presença de um único neurônio Fos-ir gigante (asterisco). NP, neuropilo. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

**B:** Fotomicrografia de detalhe do neurônio gigante mostrado na figura A (asterisco), podendo ser visualizadas as ramificações neuronais partindo deste neurônio em direção ao neuropilo (NP). Barra: 40  $\mu\text{m}$ .

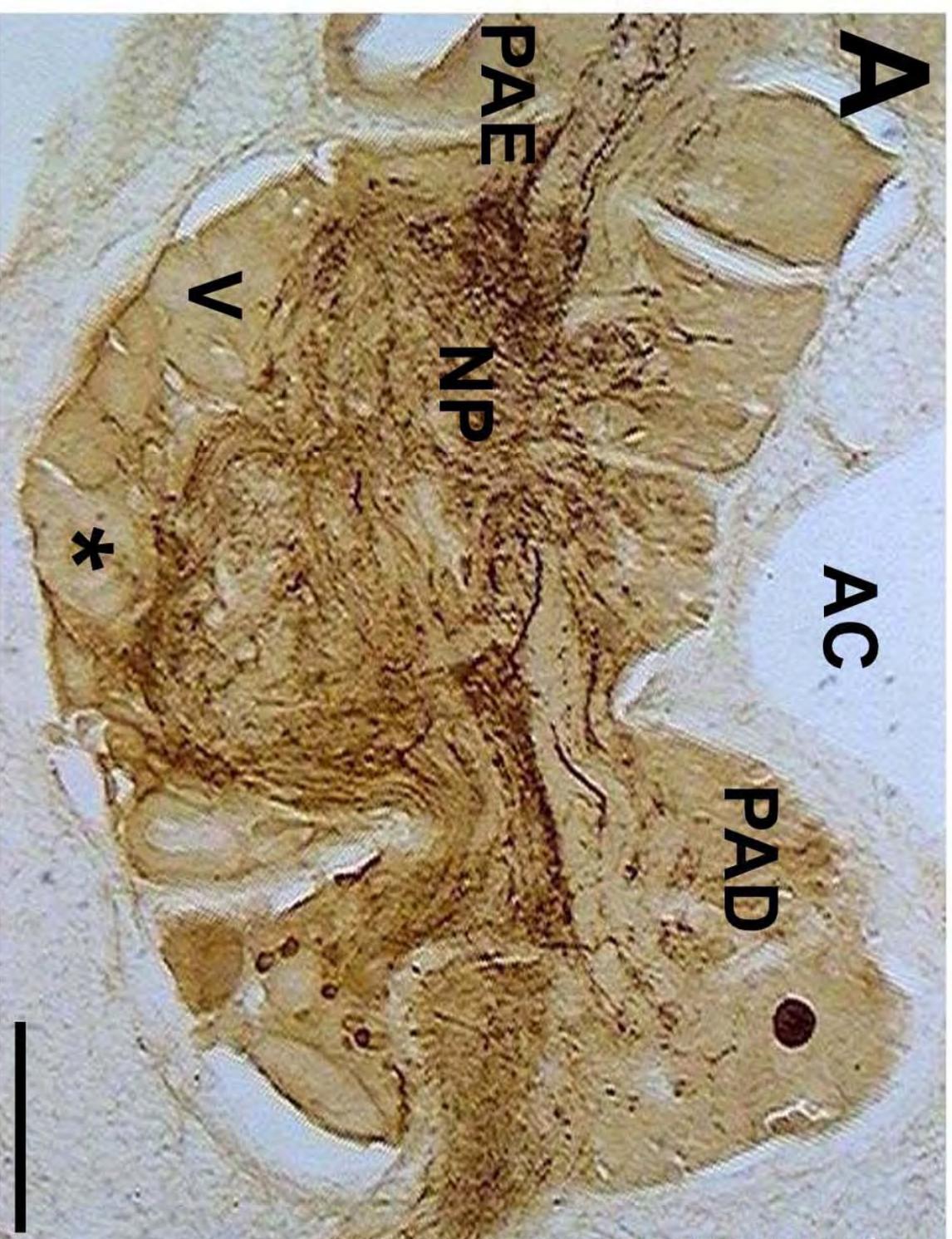


**Figura 26** – Fotomicrografia de cortes horizontais do gânglio parietal direito.

**A:** Visão topográfica do gânglio mostrando a região anterior (a) ao neuropilo (NP) do gânglio e a região posterior (p) ao neuropilo. Na região anterior pode-se observar um neurônio grande (seta) Fos-ir. Na região posterior aparece um grupamento maior de neurônios imunorreativos de tamanho médio (seta dupla). Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhe da região anterior (a) ao neuropilo (NP), onde se destaca a presença de um neurônio grande imunorreativo (seta), cujo axônio apresenta-se também fortemente imunorreativo (cabeça de seta) dirigindo-se para o neuropilo (NP) do gânglio, parecendo seguir para o gânglio visceral. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

**C:** Detalhe da região posterior (p) ao neuropilo (NP) mostrando neurônios Fos-ir de tamanho médio (seta dupla) e de tamanho grande (seta). Barra: 160  $\mu\text{m}$ .



**Figura 27 – A:** Fotomicrografia de secção horizontal medial do complexo subesofageano mostrando o gânglio parietal direito (PAD), o gânglio visceral (V) e o gânglio parietal esquerdo (PAE). No gânglio visceral (V) pode-se observar uma região denominada posterior (asterisco) ao neuropilo (NP). AC, artéria cefálica. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

**B:** Fotomicrografia de detalhe de uma secção mais medial do gânglio visceral, identificando neurônios médios (seta dupla), grandes (seta pequena) e gigantes (seta larga) localizados na região posterior do gânglio. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.2 – GRUPO 3 HORAS APÓS O ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO**

O padrão de distribuição de neurônios imunorreativos à c-Fos foi muito semelhante ao grupo controle, apresentando apenas um maior número de neurônios marcados, porém, outros grupos que foram imunonegativos apresentaram imunomarcção (Fig. 28).

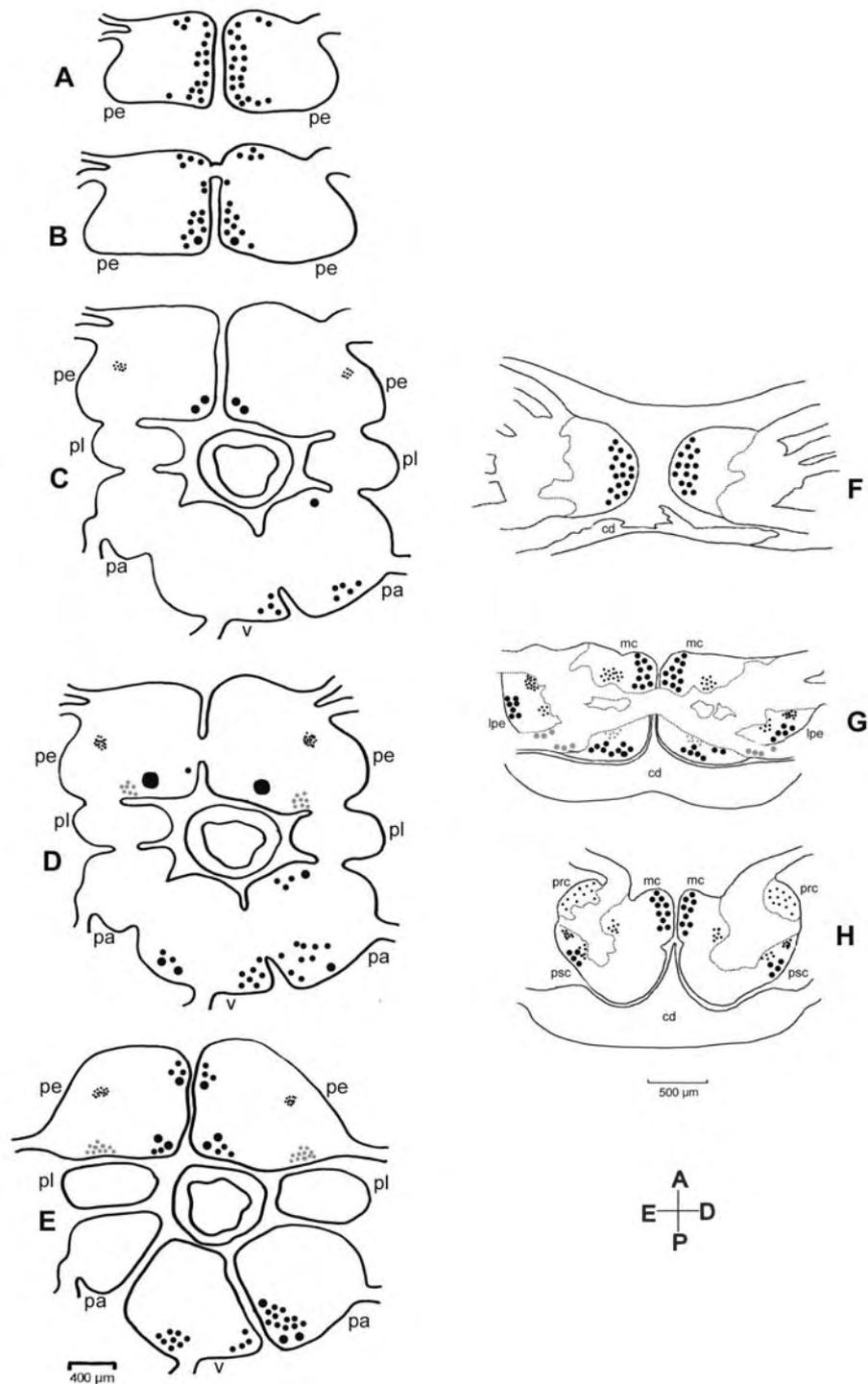
##### **4.2.2.1 – GÂNGLIOS CEREBRAIS**

Nos animais submetidos ao estímulo térmico aversivo e sacrificados 3h após a exposição à placa quente, nos gânglios cerebrais o padrão de localização da distribuição neuronal foi muito semelhante ao observado no grupo controle, porém os grupos neuronais observados apresentaram uma quantidade maior de células (uma média de 20 células a mais) em relação aos animais controle. Além destes mesmos grupos neuronais já identificados, em cortes mediais do gânglio, ao nível da comissura cerebral, um grupo de aproximadamente 10 células pequenas (10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foi identificado no lobo pleural do pós-cérebro, na região posterior ao neuropilo, bem próximo a ele (Fig. 29).

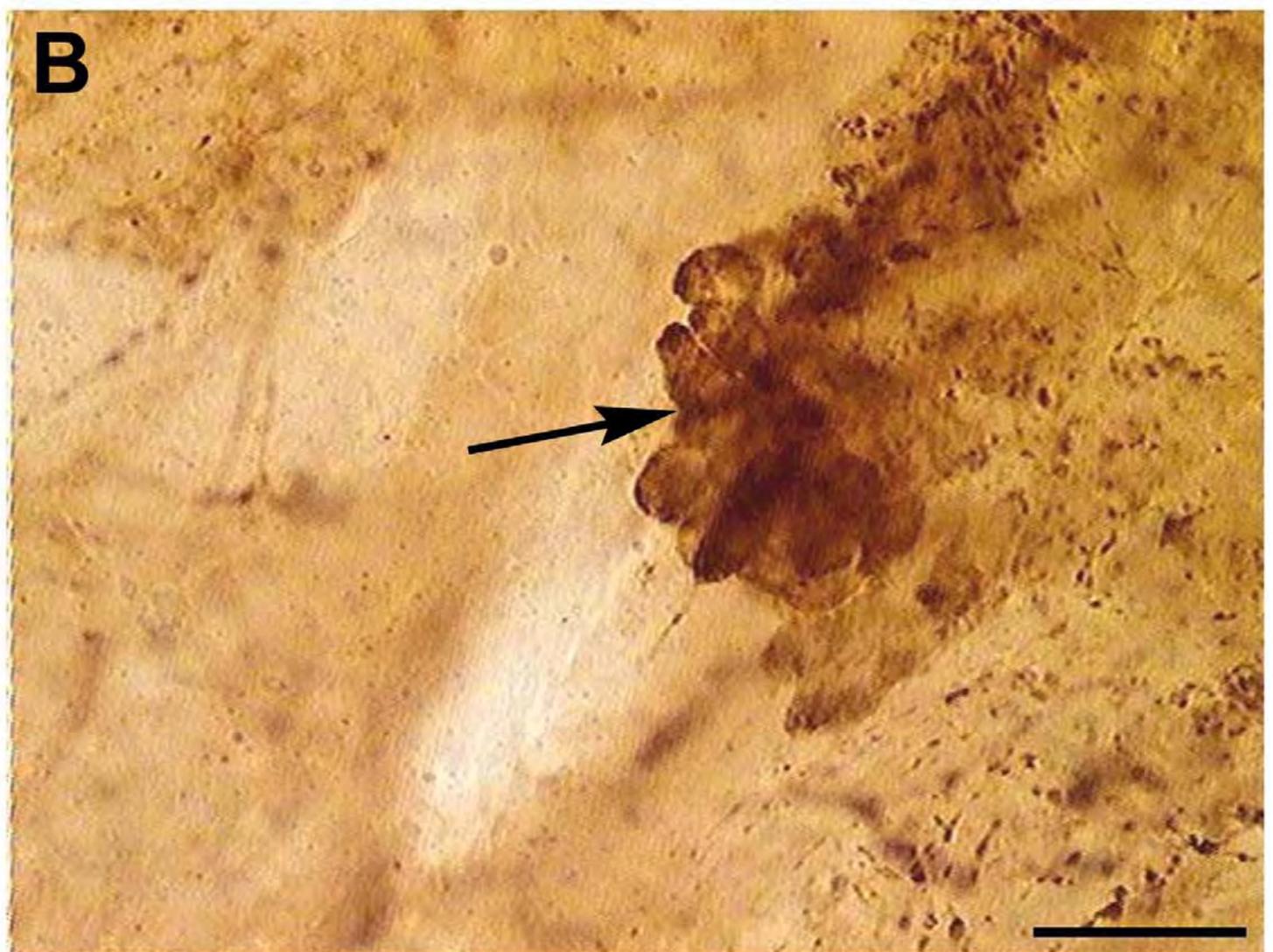
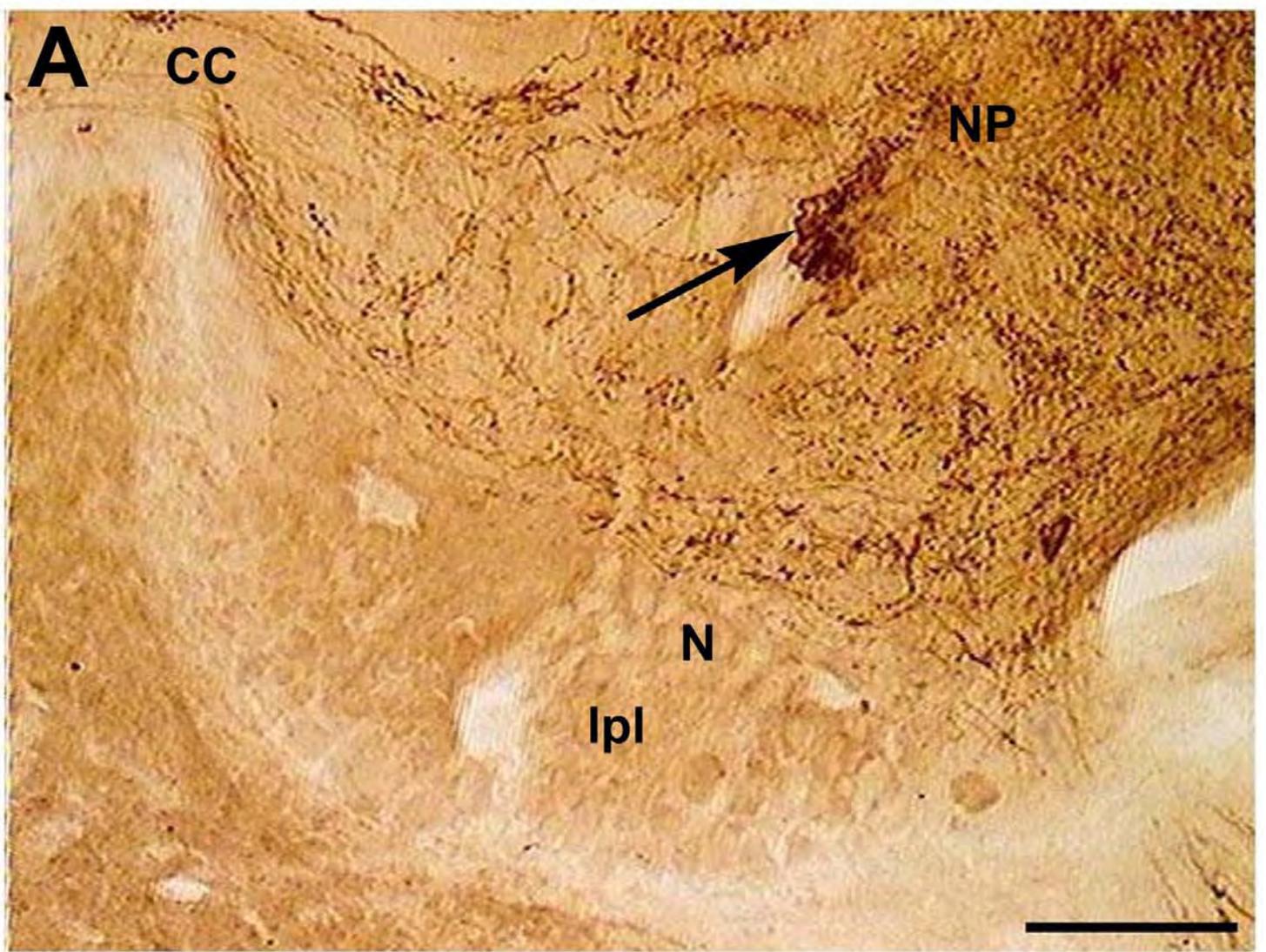
#### **4.2.2.2 – COMPLEXO SUBESOFAGEANO**

Também nos gânglios pedais o padrão de distribuição neuronal manteve-se o mesmo, porém observou-se uma maior quantidade de neurônios Fos-ir nas regiões mediais e posterior em cortes ventrais dos gânglios, bem como o aparecimento de um grupo neuronal (10 células) de tamanho médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro) localizadas na margem póstero-lateral do gânglio, próximo ao conetivo pedal-pleural (Fig. 30). Em cortes mais dorsais, este grupo neuronal aparecia localizado na região posterior à emergência do nervo do gânglio pedal. Em secções ventrais deste gânglio, neurônios grandes (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foram identificados em localização posterior (aproximadamente 6 células) (Fig. 31).

A quantidade de neurônios Fos-ir também foi maior no gânglio visceral e principalmente no parietal direito dos animais sacrificados 3h após o estímulo térmico aversivo, porém o padrão de distribuição e localização continuou sendo o mesmo dos animais controle (Fig. 32).



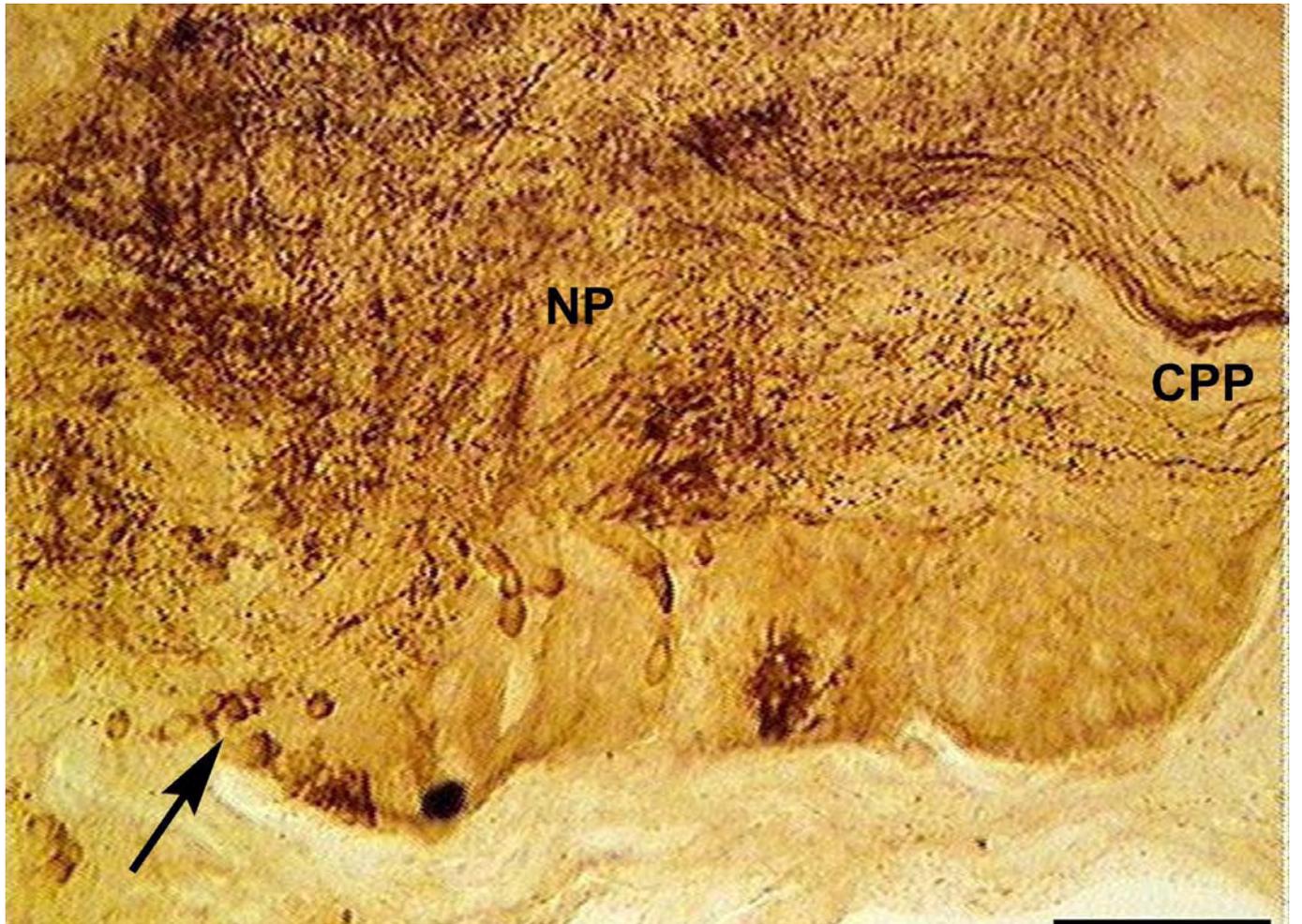
**Figura 28** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus* em animais sacrificados 3 h após o estímulo térmico aversivo. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio visceral; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro; lpe; lobo pedal. Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).



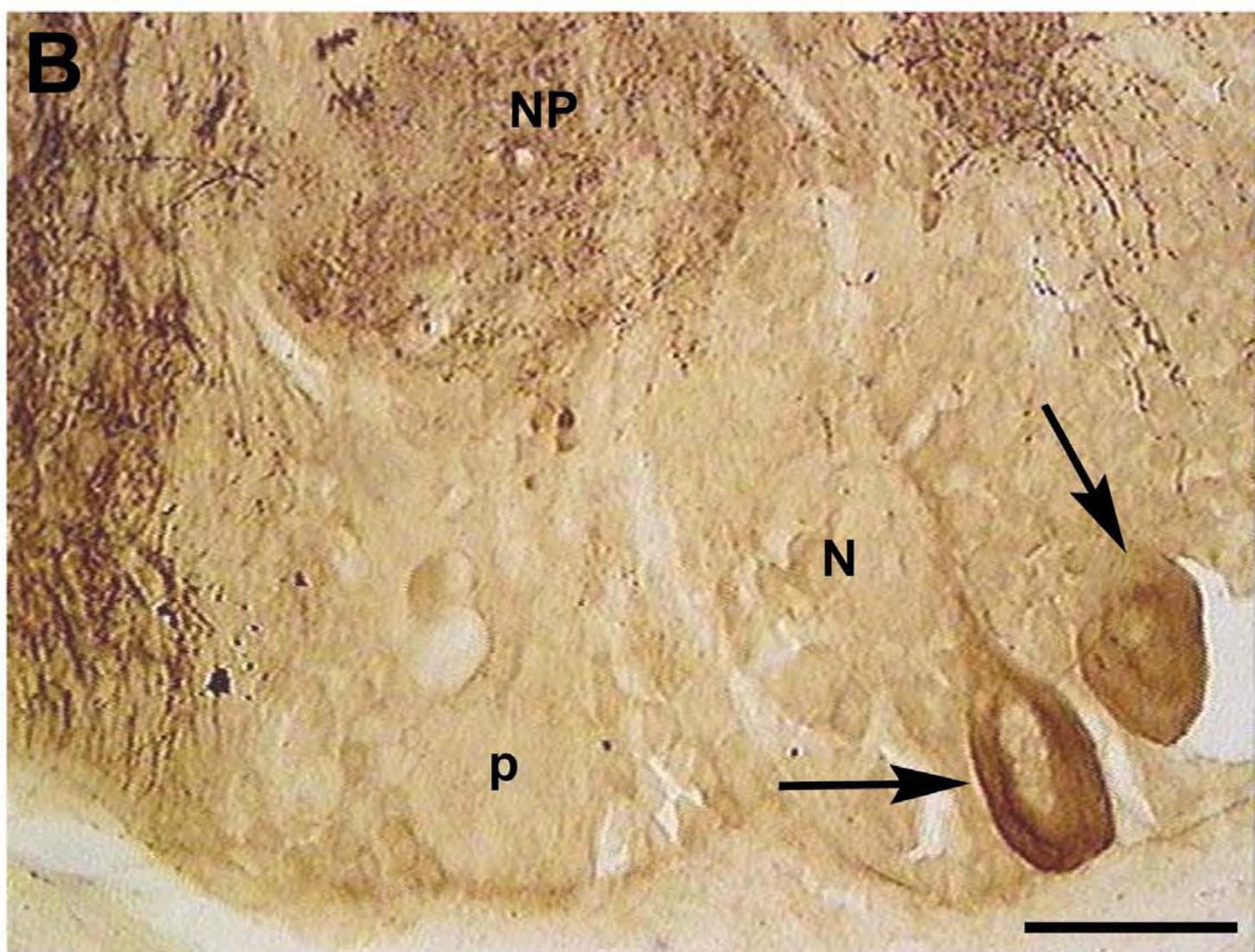
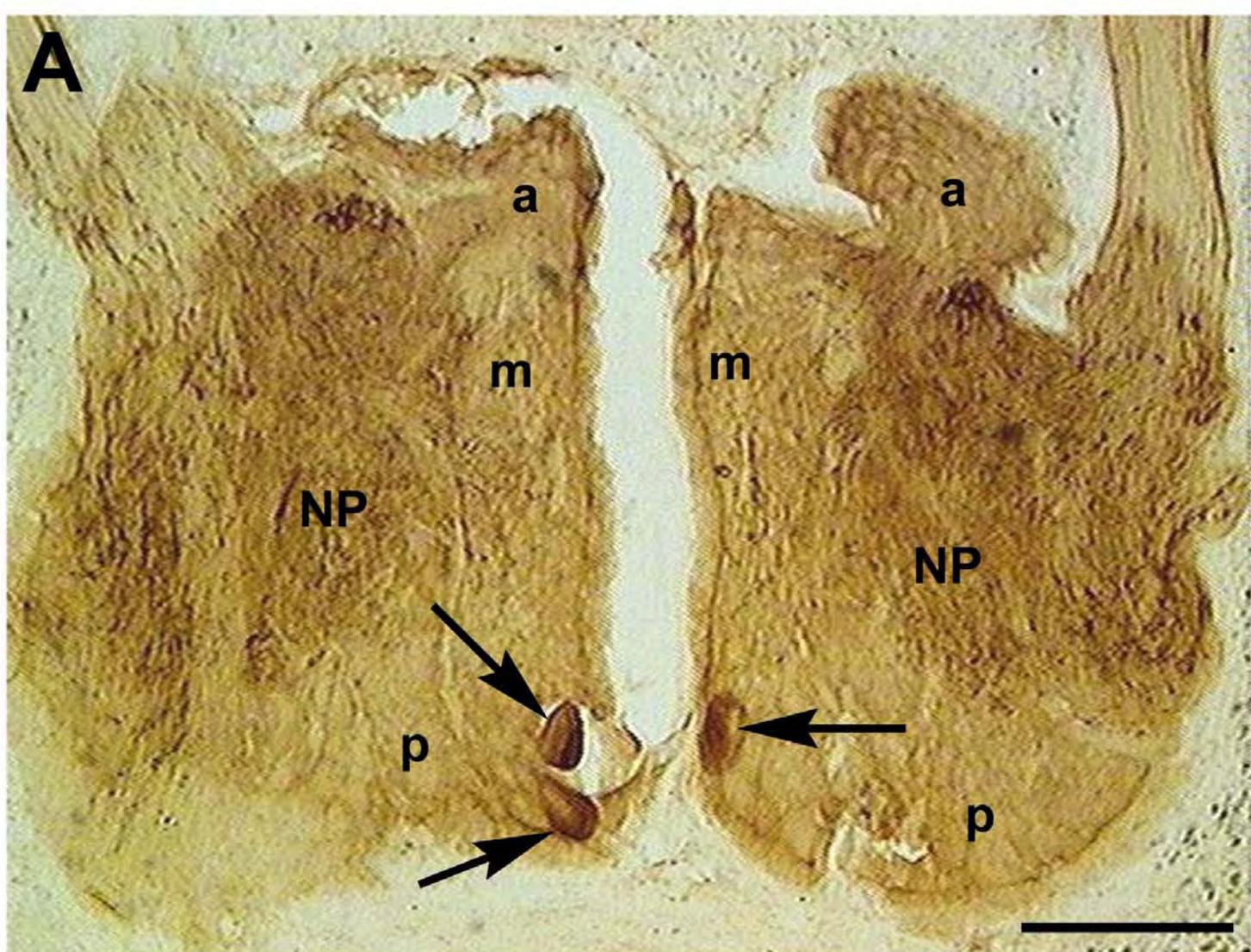
**Figura 29** – Fotomicrografia de cortes do hemigânglio cerebral direito ao nível da comissura cerebral (CC).

**A:** Lobo pleural do pós-cérebro (lpl) mostrando neurônios imunonegativos (N) e um grupo de neurônios pequenos Fos-ir (seta) localizados em posição posterior ao neuropilo (NP) do gânglio. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhes do grupo de neurônios pequenos indicados pela seta na figura anterior. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

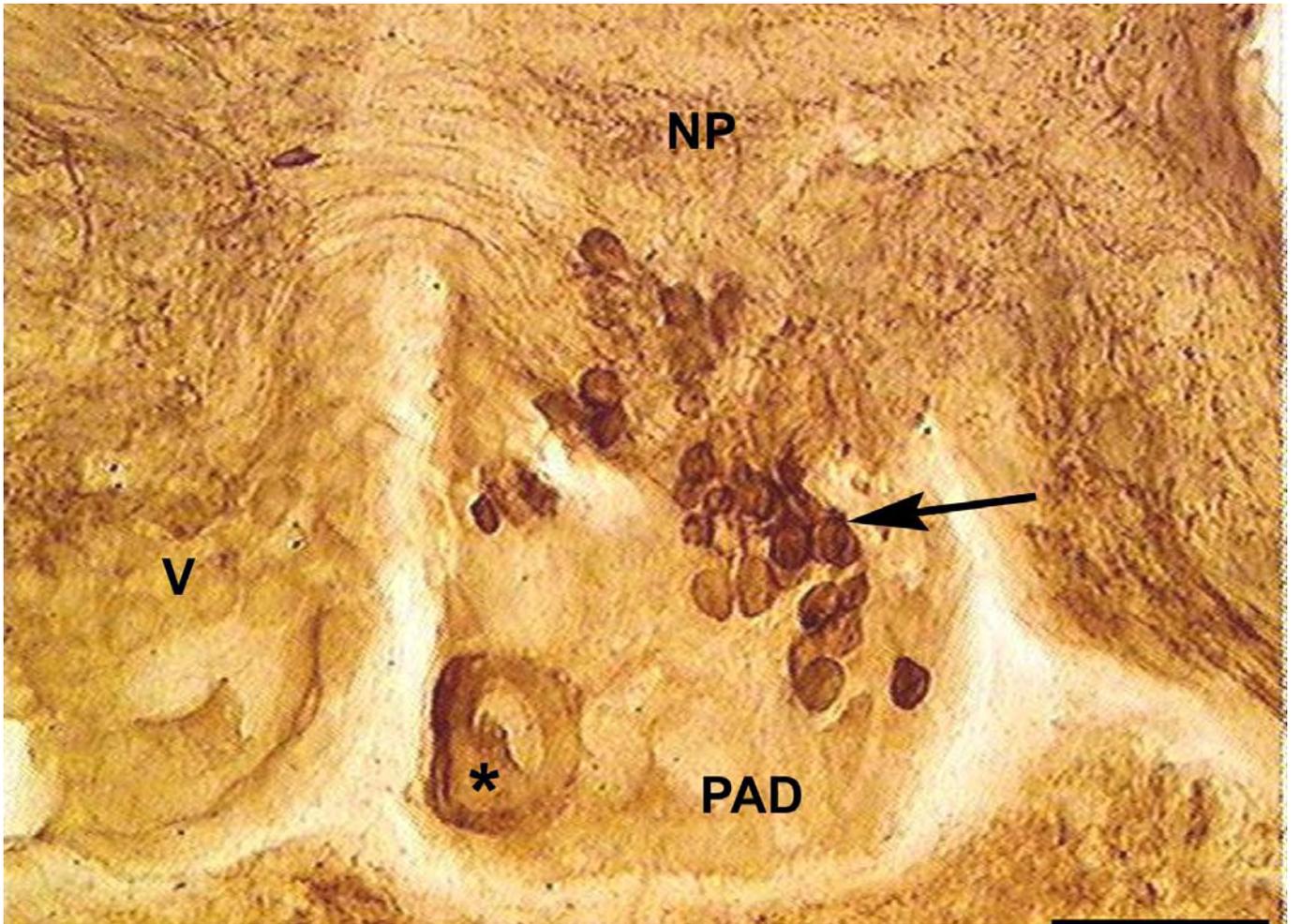


**Figura 30** – Fotomicrografia de secção horizontal do hemigânglio pedal esquerdo mostrando em grupo de neurônios posteriores de tamanho médio Fos-ir (seta) na margem póstero-lateral do gânglio. CPP, comissura pedal principal; NP, neuropilo. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .



**Figura 31 - A:** Fotomicrografia de secção ventral dos gânglio pedais mostrando em grupo de neurônios grandes Fos-ir (seta) na posição posterior (p) do gânglio. a, neurônios anteriores; m, neurônios mediais; NP, neuropilo. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

**B:** Fotomicrografia de detalhe dos neurônios grandes Fos-ir apontados pela seta na figura anterior. Neurônios posteriores (p) imunonegativos (N). Barra: 160  $\mu\text{m}$ .



**Figura 32** – Fotomicrografia de secção horizontal do complexo subesofageano mostrando o gânglio visceral (V) e o gânglio parietal direito (PAD), onde aparece uma grande quantidade de neurônios Fos-ir de tamanho médio (seta) na região posterior ao neuropilo (NP) do gânglio e um neurônio gigante (asterisco) no limite póstero-lateral esquerdo do gânglio. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

### **4.2.3 – GRUPO 6 HORAS APÓS O ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO**

O padrão de distribuição neuronal manteve-se semelhante ao grupo 3h, porém com uma quantidade maior de neurônios Fos-ir em todas as regiões dos gânglios (Fig. 33).

#### **4.2.3.1 – GÂNGLIOS CEREBRAIS**

Nos animais sacrificados 6h após a exposição ao estímulo aversivo foi encontrado o maior número de neurônios Fos-ir no gânglio cerebral entre todos os grupos comparados. Embora os grupos neuronais detectados sejam os mesmos encontrados no grupo 3h, o número de neurônios foi maior (aproximadamente 40 células a mais), principalmente na região do mesocérebro e do lobo pedalar do pós-cérebro (Fig. 34).

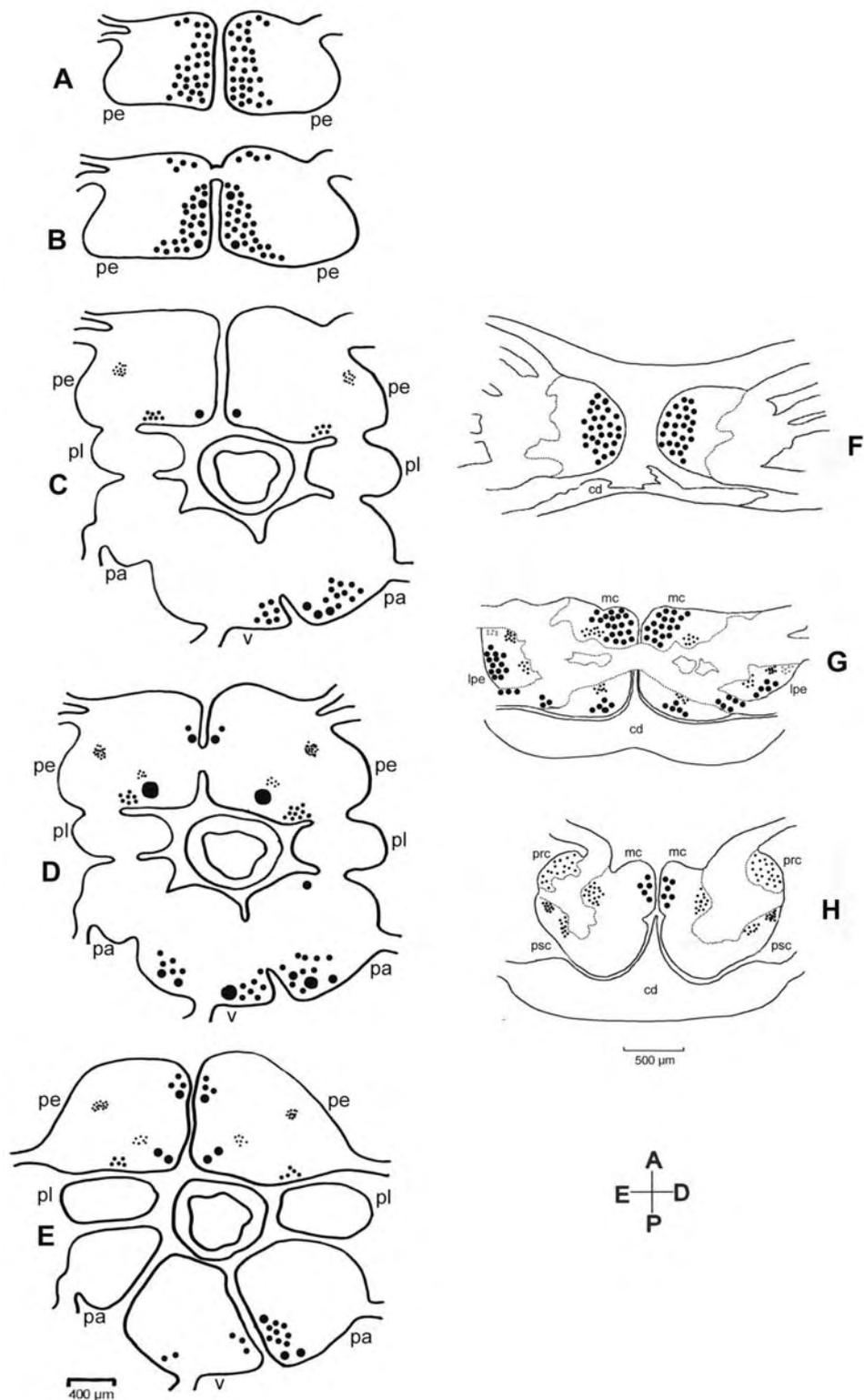
#### **4.2.3.2 – COMPLEXO SUBESOFAGEANO**

Nos gânglios pedais a distribuição neuronal também permaneceu constante em relação ao grupo 3h, porém com uma quantidade maior de neurônios Fos-ir nas regiões medial (aproximadamente 80 células a mais) e posterior (aproximadamente

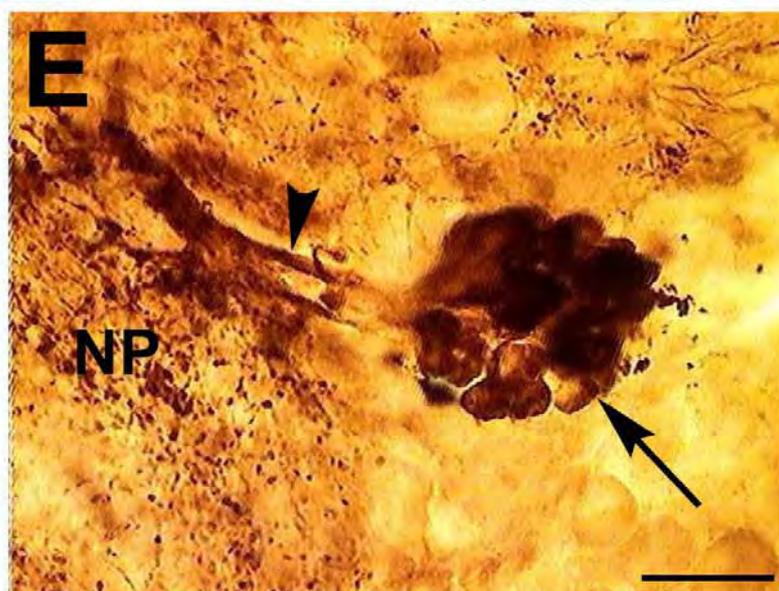
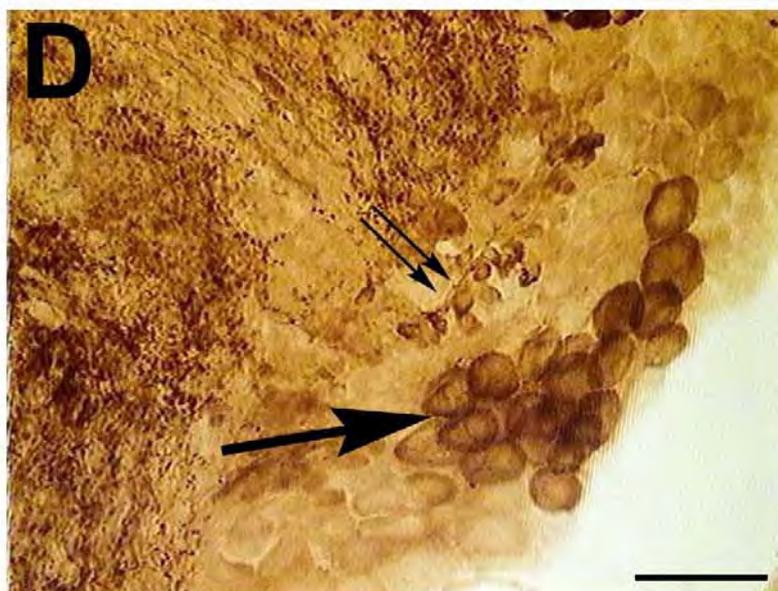
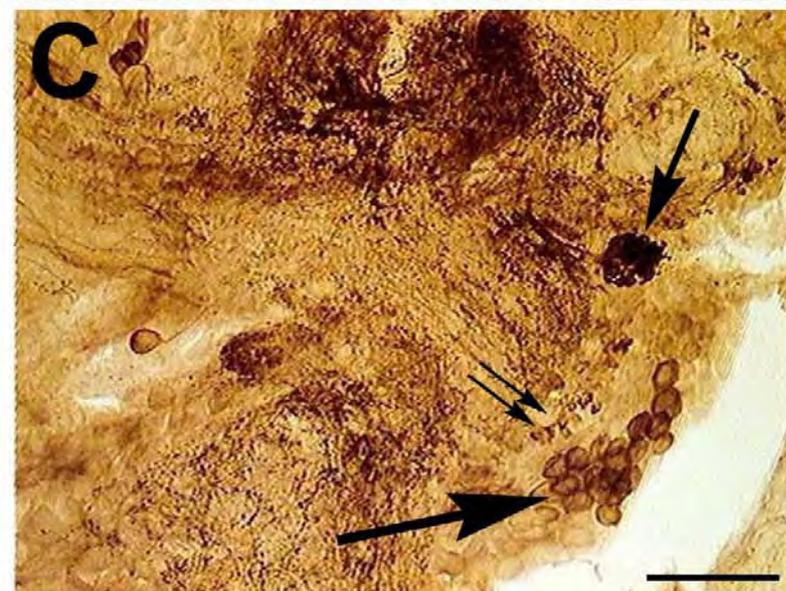
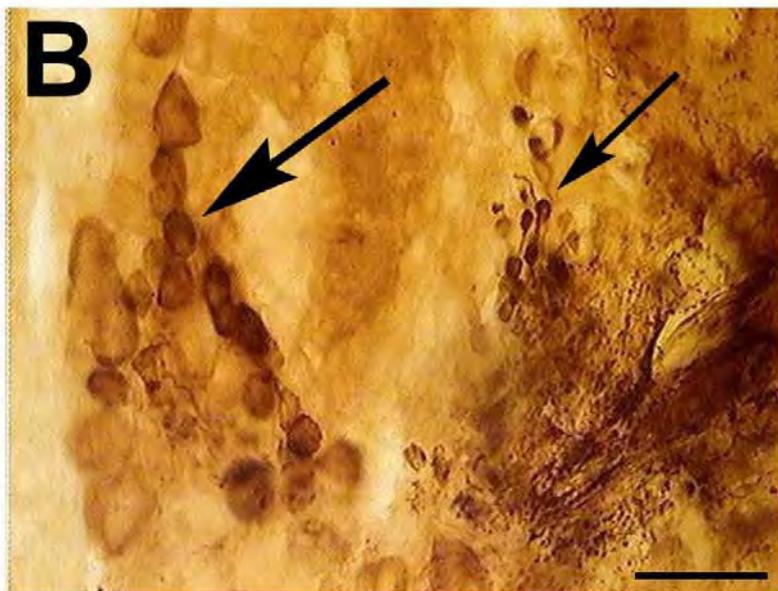
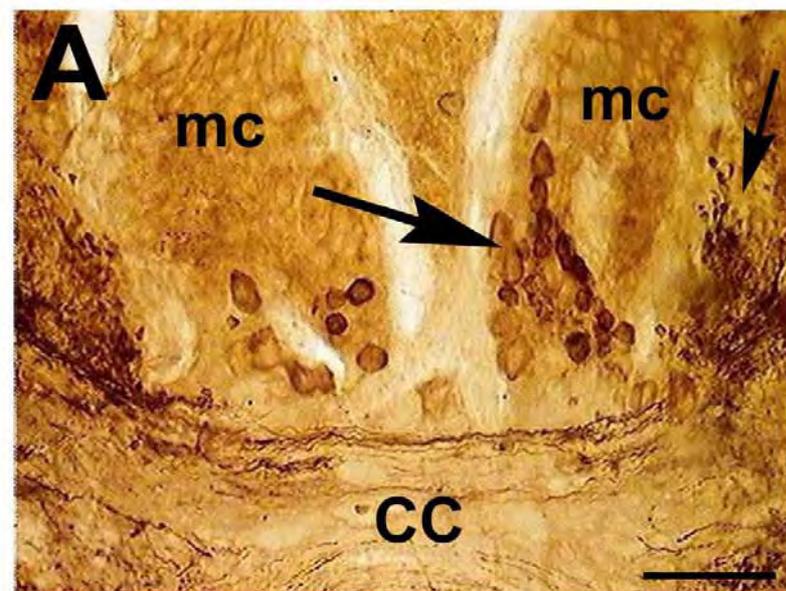
20 células a mais). Na região posterior do gânglio pedal, em cortes mais ventrais e dorsais do gânglio, 6 neurônios grandes (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foram identificados, apresentando forte imunorreação. Além disso, um grupo de neurônios pequenos (aproximadamente 15 células – 10-15  $\mu\text{m}$  de diâmetro) foi observado na região posterior do gânglio, próximo ao neuropilo, em cortes mediais e dorsais do mesmo (Fig. 35).

No gânglio parietal direito o número de neurônios Fos-ir também foi maior (15% a mais) nos animais deste grupo experimental. Além de aumentar o número de neurônios de tamanho médio (20-60  $\mu\text{m}$  de diâmetro), foram detectados neurônios grandes (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e gigantes (180-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro) imunorreativos na região posterior ao neuropilo do gânglio, próximo ao limite com o gânglio visceral (Fig. 36 A e B).

A observação do gânglio visceral também revelou um aumento no número de neurônios Fos-ir (20%) e o aparecimento de neurônios grandes (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e gigantes (180-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro) imunorreativos, principalmente no limite posterior do gânglio (Fig. 36 A e C).



**Figura 33** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus* em animais sacrificados 6 h após o estímulo térmico aversivo. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio visceral; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro; lpe, lobo pedal. Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).



**Figura 34** – Fotomicrografia de secções coronais dos gânglios cerebrais.

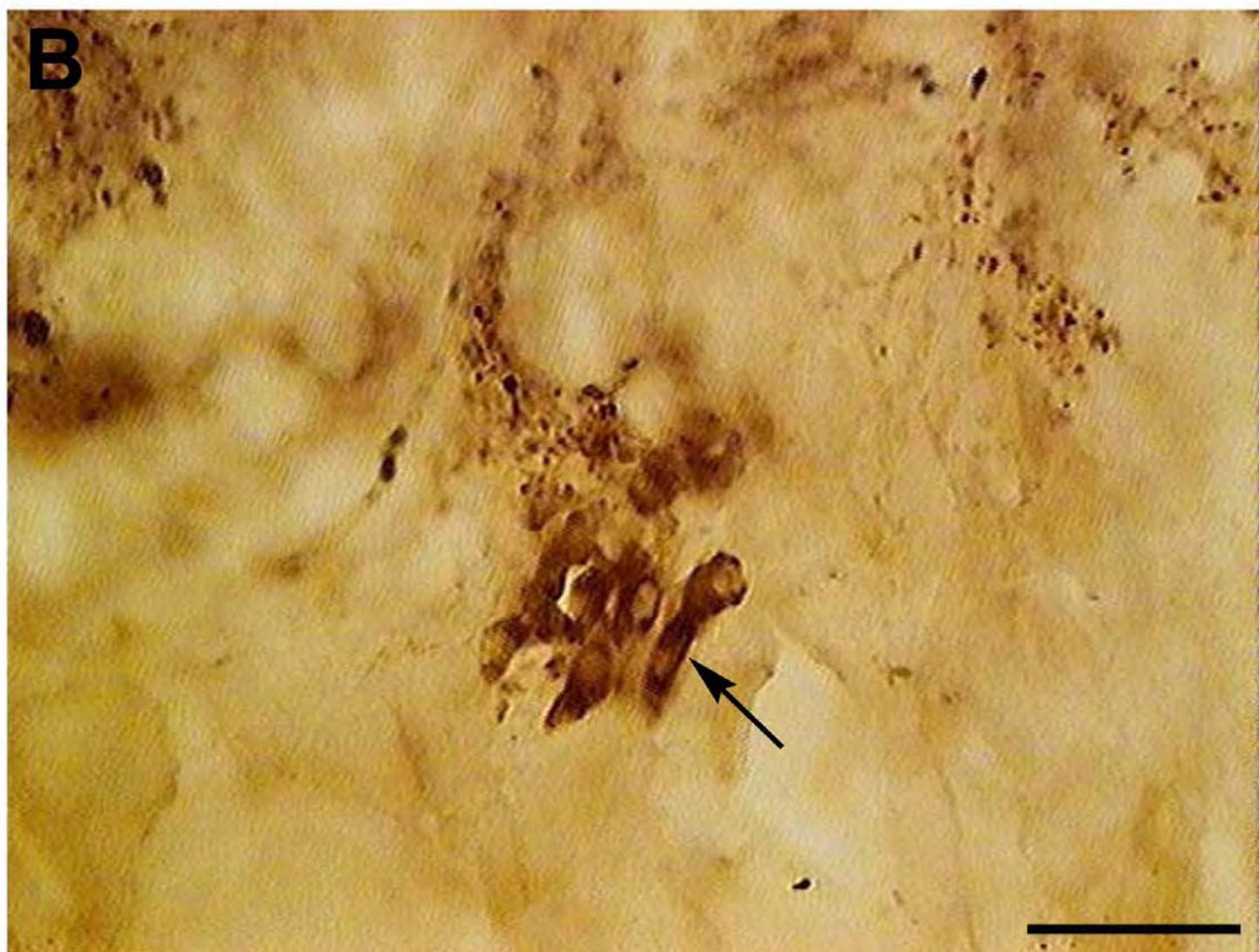
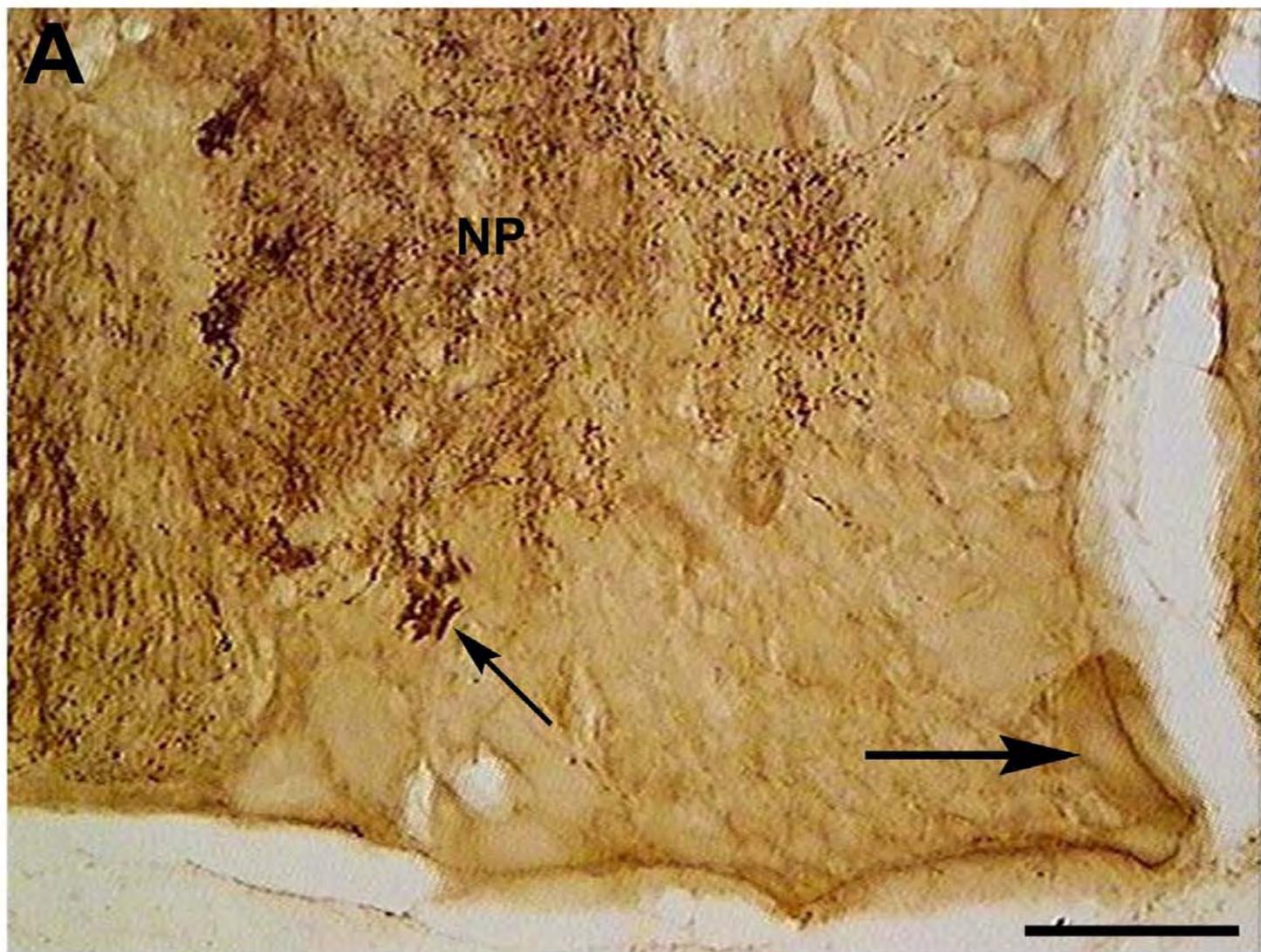
**A:** Região do mesocérebro (mc) ao nível da comissura cerebral (CC) mostrando grupos de neurônios médios Fos-ir (seta larga) e pequenos (seta). Barra: 160  $\mu$ m.

**B:** Detalhe da região do mesocérebro destacando os grupos de neurônios médios (seta larga) e pequenos (seta fina). Barra: 80  $\mu$ m.

**C:** Região do lobo pedal do pós-cérebro mostrando diferentes grupos neuronais Fos-ir (seta larga, seta dupla e seta fina). Barra: 160  $\mu$ m.

**D:** Detalhe do lobo pedal dos pós-cérebro destacando um grupo de neurônios médios Fos-ir (seta) e um grupo de neurônios pequenos também imunorreativos (seta dupla). Barra: 80  $\mu$ m.

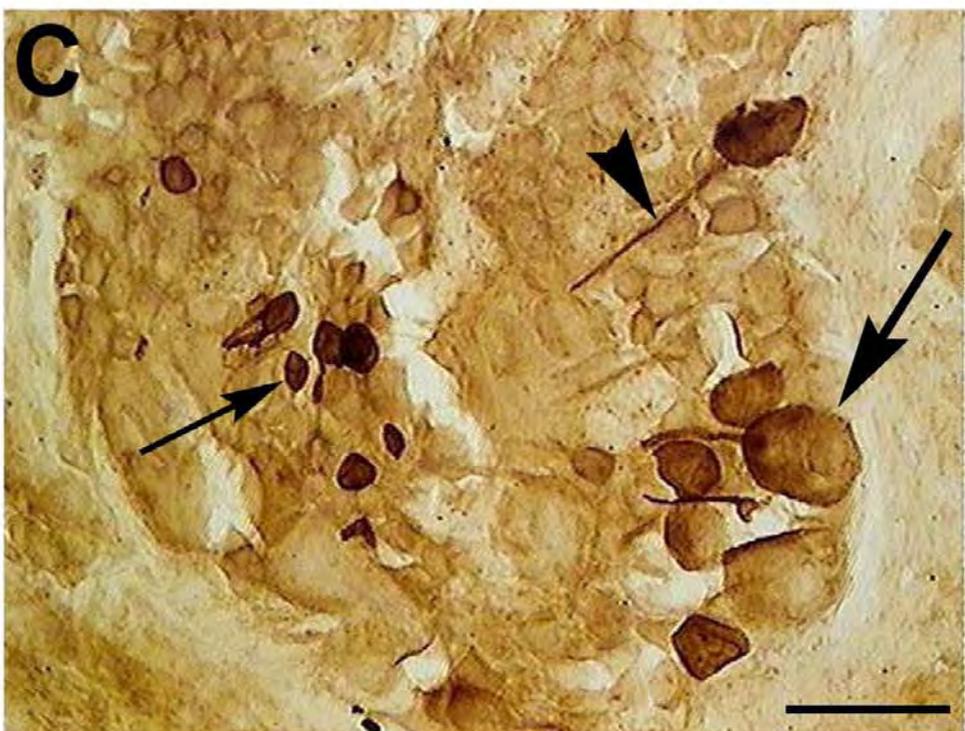
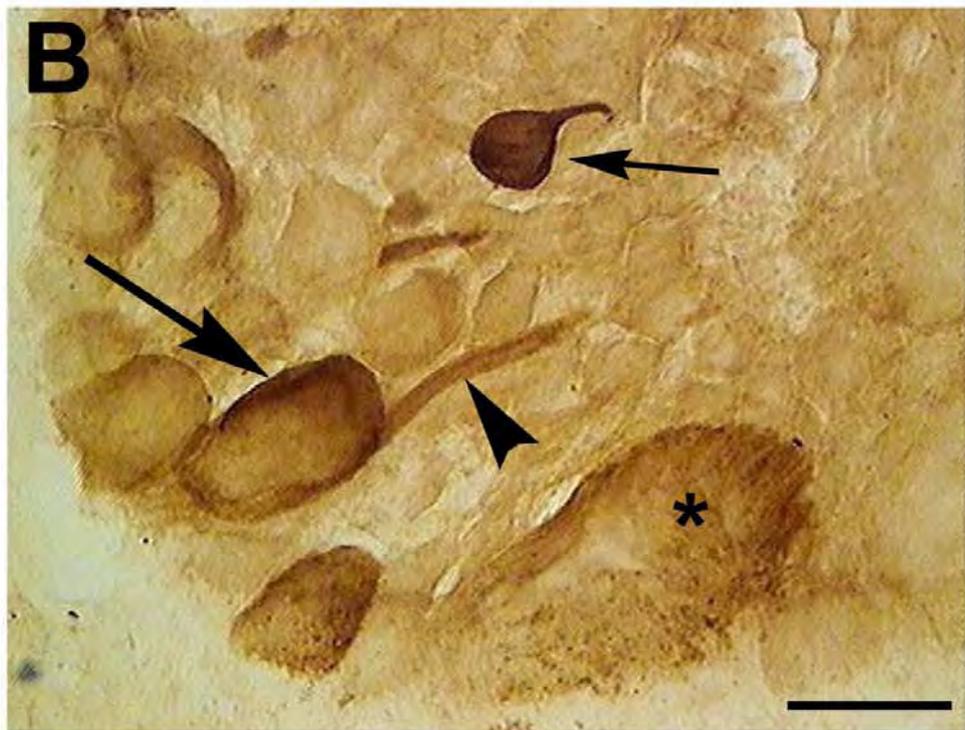
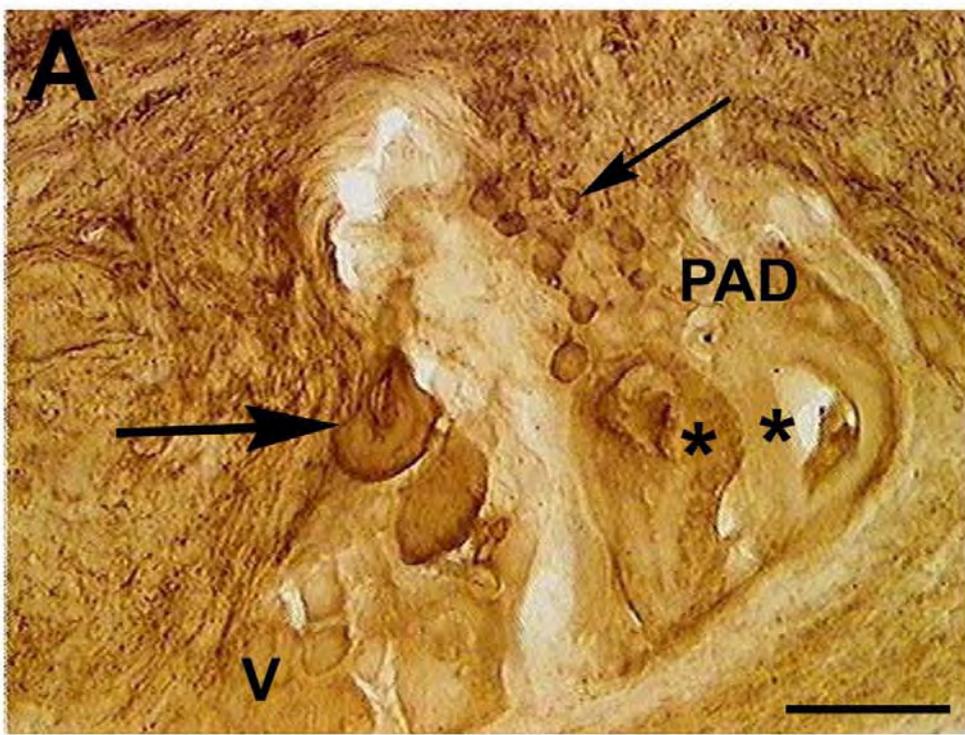
**E:** Detalhe de outro grupo neuronal do lobo pedal do pós-cérebro intensamente imunorreativo (seta larga), podendo-se identificar seus axônios (cabeça de seta) em direção ao neuropilo (NP). Barra: 40  $\mu$ m.



**Figura 35** - Fotomicrografia de secção ao nível medial do gânglio pedal.

**A:** Representação dos neurônios posteriores do gânglio mostrando um grupo de neurônios pequenos (seta fina) Fos-ir próximos ao neuropilo (NP). Também se observa um neurônio grande (seta larga) com fraca intensidade de reação no limite pósteromedial do gânglio. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhe do grupo de neurônios posteriores pequenos indicados pela seta fina na figura anterior. Barra: 40  $\mu\text{m}$ .



**Figura 36** - Fotomicrografia de secções do complexo parieto-visceral.

**A:** Corte do complexo parieto-visceral mostrando no gânglio parietal direito (PAD) neurônios médios imunorreativos (seta fina) e neurônios gigantes (asterisco). No gânglio visceral (V) neurônios grandes (seta larga) Fos-ir. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhe do gânglio parietal direito mostrando neurônios imunorreativos de tamanho médio (seta fina), grande (seta larga) e gigante (asterisco). Pode-se observar axônios Fos-ir (cabeça de seta). Barra: 80  $\mu\text{m}$ .

**C:** Detalhe do gânglio visceral mostrando neurônios médios imunorreativos (seta), neurônios grandes (seta larga) e axônios imunorreativos (cabeça de seta). Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.4 – GRUPO 12 HORAS APÓS O ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO**

Embora o padrão de distribuição neuronal tenha mantido-se semelhante ao grupo 6h, o número de neurônios reduziu na maioria dos grupamentos neuronais analisados em todos os gânglios (Fig. 37).

##### **4.2.4.1 – GÂNGLIOS CEREBRAIS**

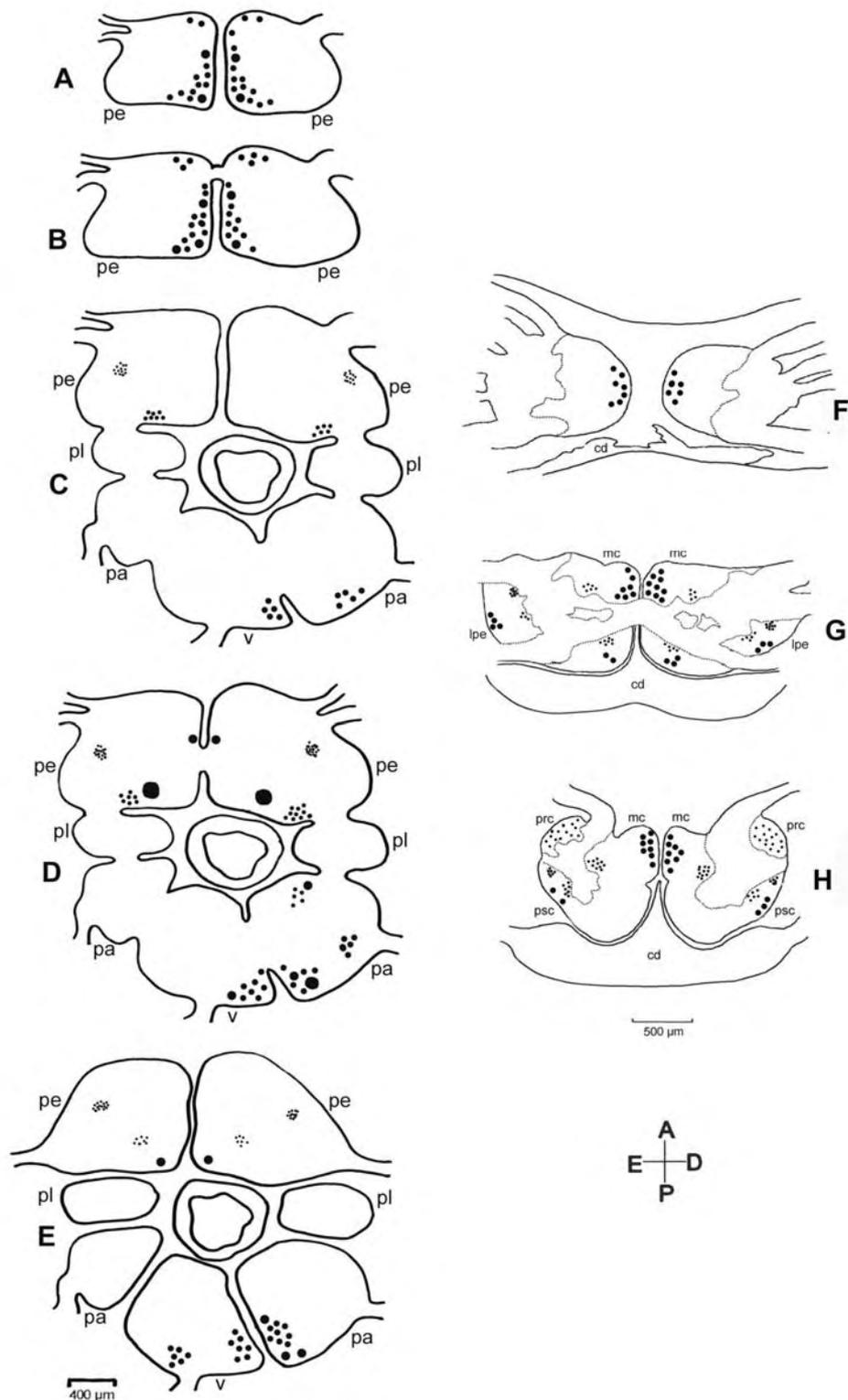
Nos animais sacrificados 12h após o estímulo térmico aversivo, a distribuição neuronal manteve-se constante em relação ao grupo anterior (6h), porém houve uma redução (aproximadamente 10%) no número de neurônios Fos-ir principalmente nas regiões do mesocérebro e do lobo pedal do pós-cérebro dos gânglios cerebrais. Além desta redução numérica, também a densitometria dos grupos neuronais da região do mesocérebro revelou uma redução significativa da intensidade da reação imunoistoquímica ( $p < 0,001$ ) (Fig. 49).

##### **4.2.4.2 – COMPLEXO SUBESOFAGEANO**

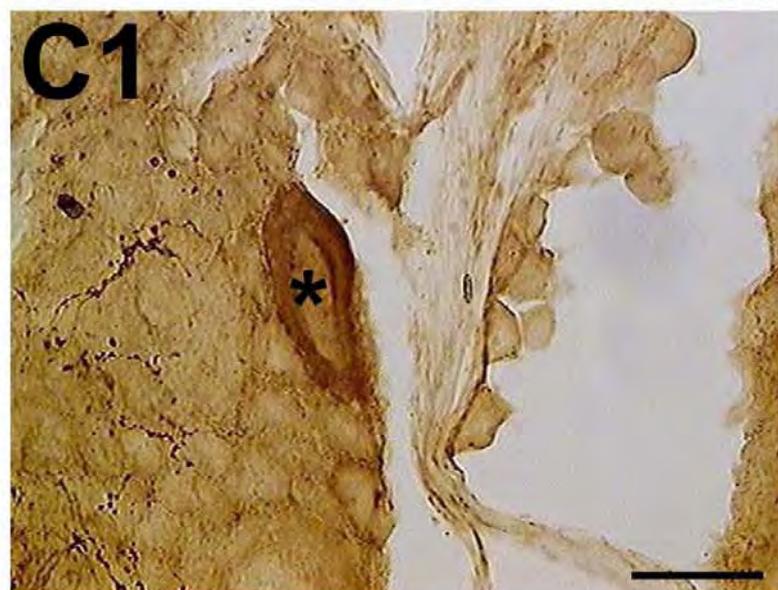
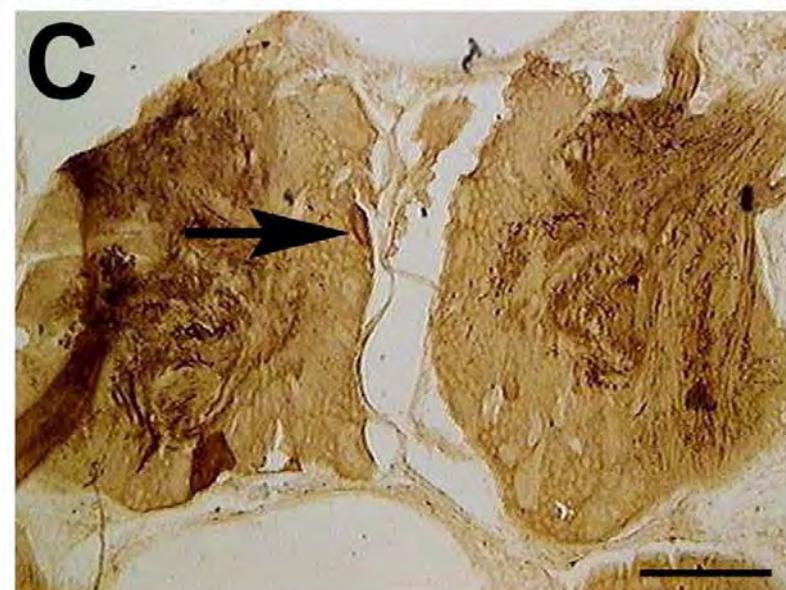
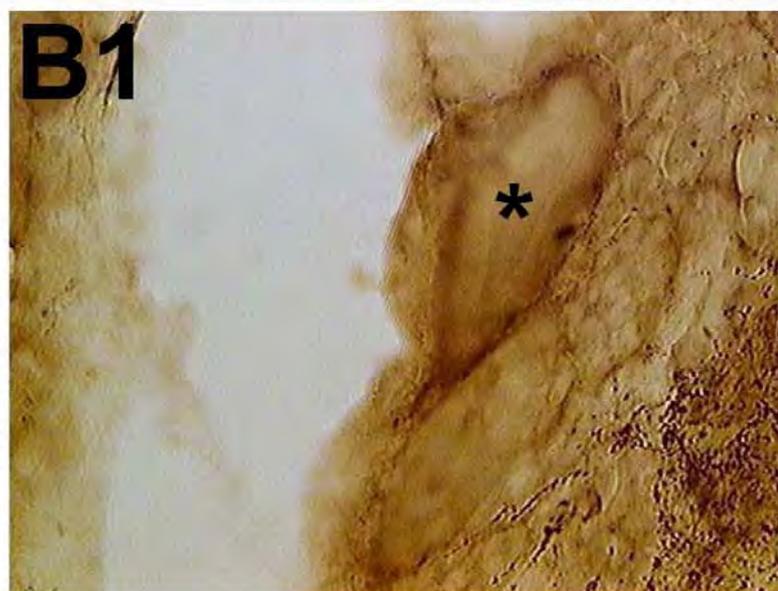
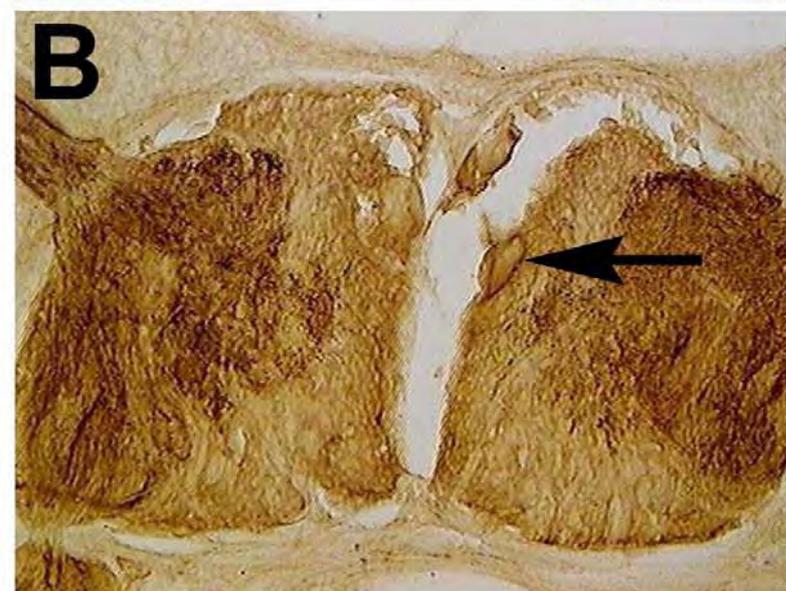
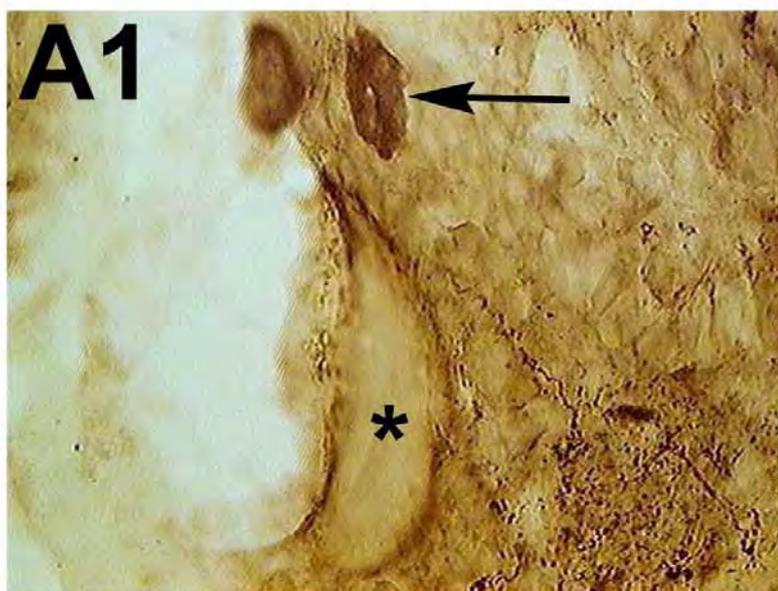
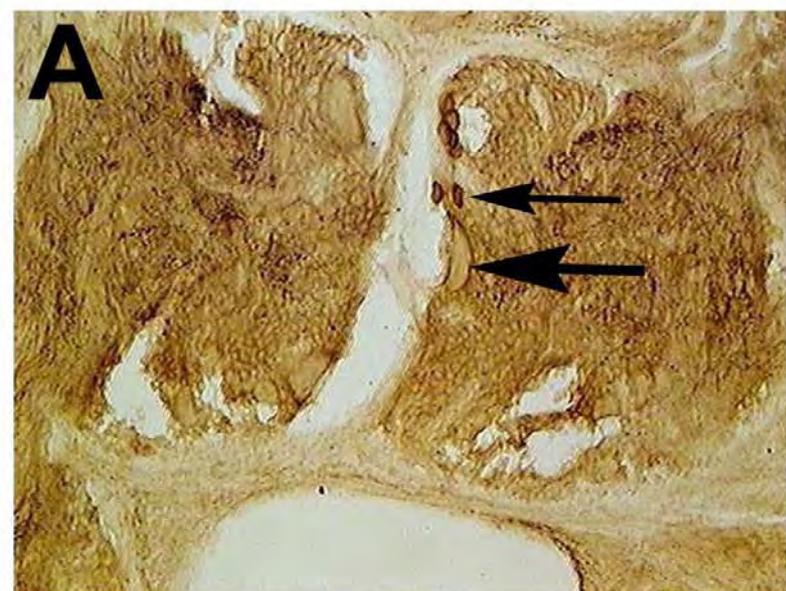
Nos gânglios pedais deste mesmo grupo experimental, a distribuição neuronal manteve-se semelhante ao grupo 6h, porém com uma menor quantidade de

neurônios Fos-ir em todas as regiões dos gânglios, em todos os níveis de secção (aproximadamente 40% de redução no número de células). Um fato marcante neste grupo experimental foi a marcação de um neurônio grande, denominado Pd4 por Swarowsky e cols. (2005), localizado na região medial do gânglio (Fig. 38 B e C), identificado em secções ventrais, cujo aparecimento em grupos experimentais anteriores o mostrava negativo (Fig. 38 A).

Nos gânglios parietal direito e visceral o padrão de distribuição neuronal também manteve-se o mesmo, apresentando uma redução no número de neurônios Fos-ir em ambos os gânglios (aproximadamente 15% a menos) (Fig. 39).



**Figura 37** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus* em animais sacrificados 12 h após o estímulo térmico aversivo. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio visceral; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro; lpe, lobo pedal. Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).



**Figura 38** - Fotomicrografia de secções em plano ventral dos gânglios pedais.

**A:** Gânglio pedal de animal sacrificado 3h após o estímulo térmico aversivo mostrando neurônios mediais de tamanho médio Fos-ir (seta fina) e neurônio medial grande imunonegativo (seta larga).

**A1:** Detalhe dos neurônios mediais de tamanho médio Fos-ir (seta) e neurônio medial grande imunonegativo (asterisco).

**B:** Gânglio pedal de animal sacrificado 12h após o estímulo térmico aversivo mostrando o neurônio grande medial (seta larga) aparecendo imunorreativo.

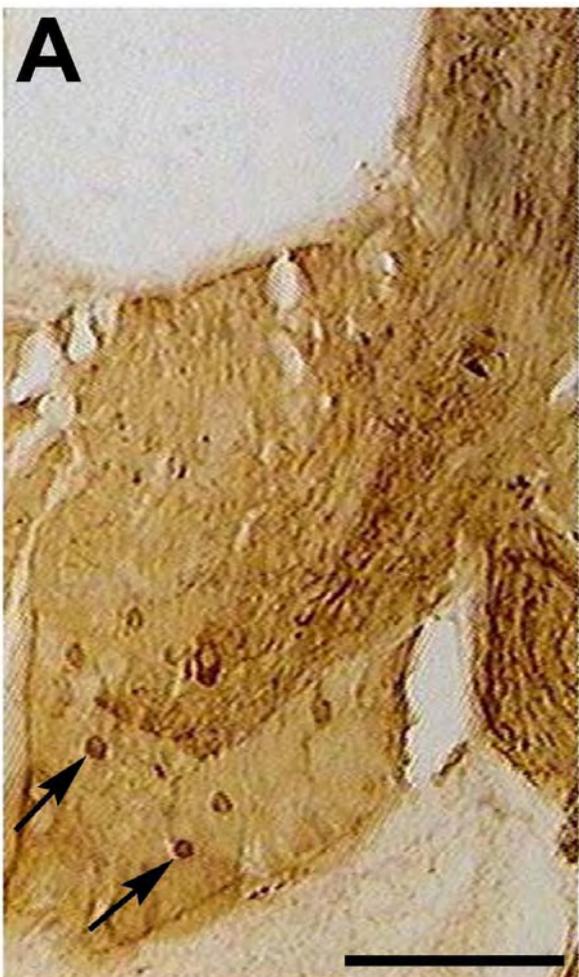
**B1:** Detalhe do neurônio grande medial imunorreativo (asterisco).

**C:** Gânglio pedal de animal sacrificado 18h após o estímulo térmico aversivo mostrando neurônio grande medial imunorreativo (seta larga).

**C1:** Detalhe do neurônio grande medial imunorreativo (asterisco).

Barra: A,B,C= 400  $\mu\text{m}$ .

Barra: A1, B1, C1= 80  $\mu\text{m}$ .



**Figura 39 – A:** Fotomicrografia do gânglio parietal direito mostrando neurônios posteriores de tamanho médio (seta) imunorreativos à c-Fos.

**B:** Fotomicrografia do gânglio visceral mostrando poucos neurônios médios Fos-ir (setas largas) nas regiões póstero-laterais do gânglio.

Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

#### **4.2.5 – GRUPO 18 HORAS APÓS O ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO**

Novamente aparece uma manutenção da localização de neurônios Fos-ir em relação aos grupos experimentais anteriores (Fig. 40).

##### **4.2.5.1 – GÂNGLIOS CEREBRAIS**

Nos animais sacrificados 18h após o estímulo térmico aversivo, nos gânglios cerebrais houve uma manutenção do padrão de distribuição e número de neurônios em relação ao grupo anterior nas regiões do mesocérebro, do pró-cérebro e do lobo pedal do pós-cérebro. Em secções mediais e dorsais, nenhum neurônio Fos-ir foi detectado no lobo pleural do pós-cérebro neste grupo experimental (Fig. 41).

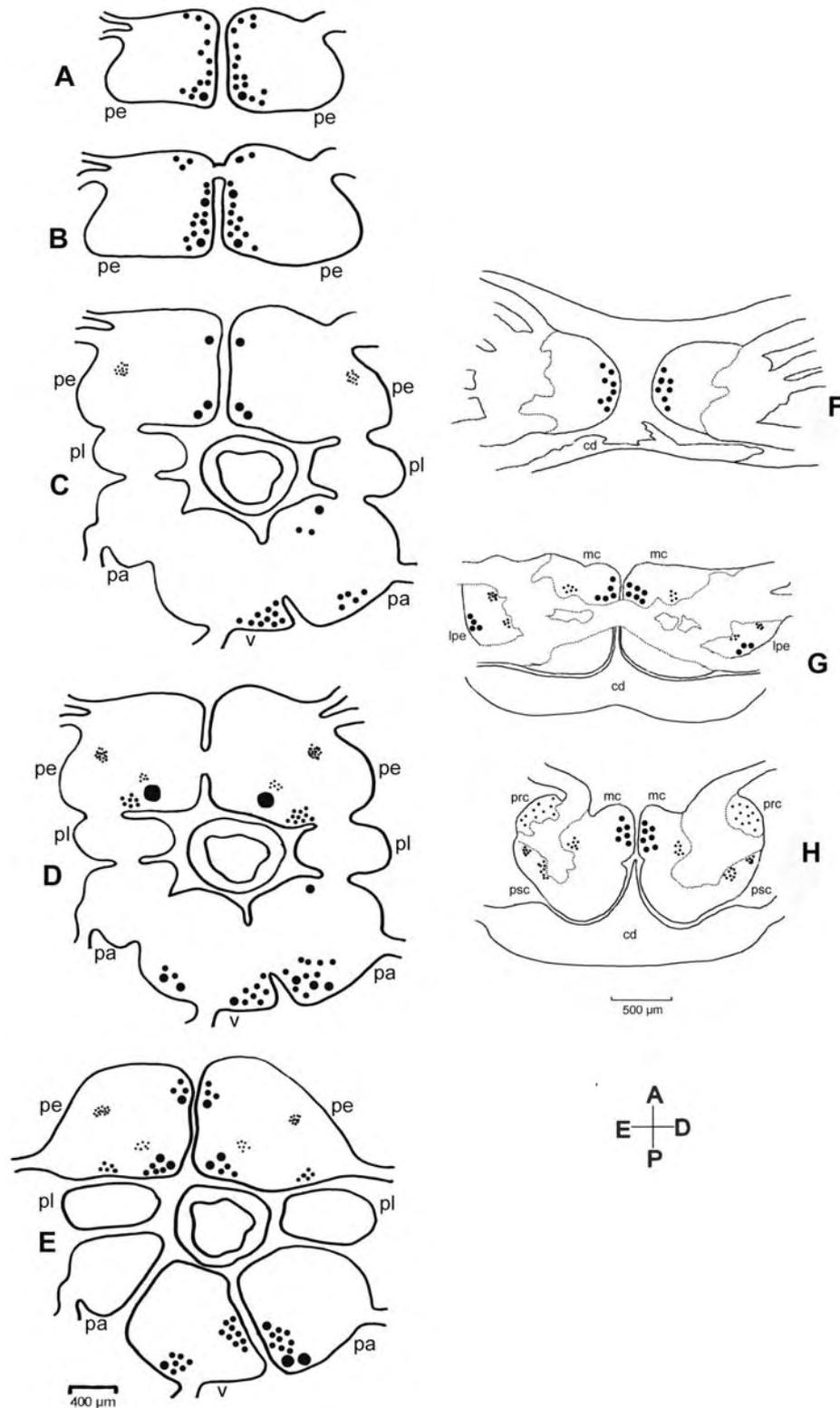
##### **4.2.5.2 – COMPLEXO SUBESOFAGEANO**

A observação dos gânglios pedais revelou um aumento no número de neurônios Fos-ir nas quatro regiões do gânglio em comparação ao grupo experimental 12h. Nos neurônios anteriores, aproximadamente 20 células a mais foram identificadas; no grupo de neurônios mediais houve um aumento de aproximadamente 30 células; no grupo de neurônios laterais o aumento foi de

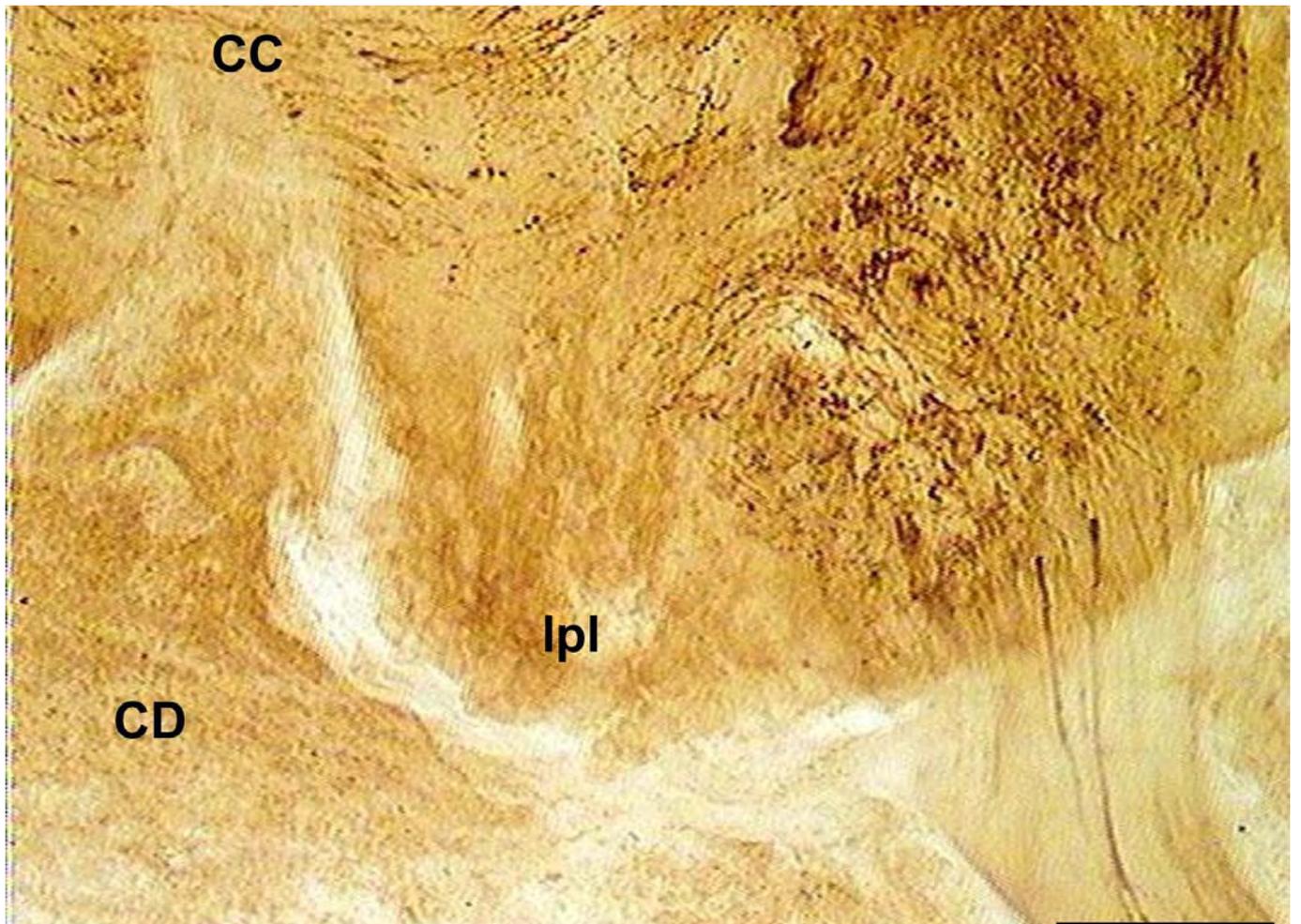
aproximadamente 20 células; e nos neurônios posteriores aproximadamente 40 células Fos-ir foram detectadas a mais quando comparada com a região posterior do mesmo gânglio do grupo 12h. Além disso, o neurônio Pd4 também mostrou-se imunorreativo à c-Fos (Fig. 38 C).

No gânglio parietal direito também houve um aumento no número de neurônios Fos-ir (20% aproximadamente) da região posterior ao neuropilo, ainda apresentando neurônios grandes (90-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e gigantes (180-200  $\mu\text{m}$  de diâmetro) imunomarcados (Fig. 42 A e B).

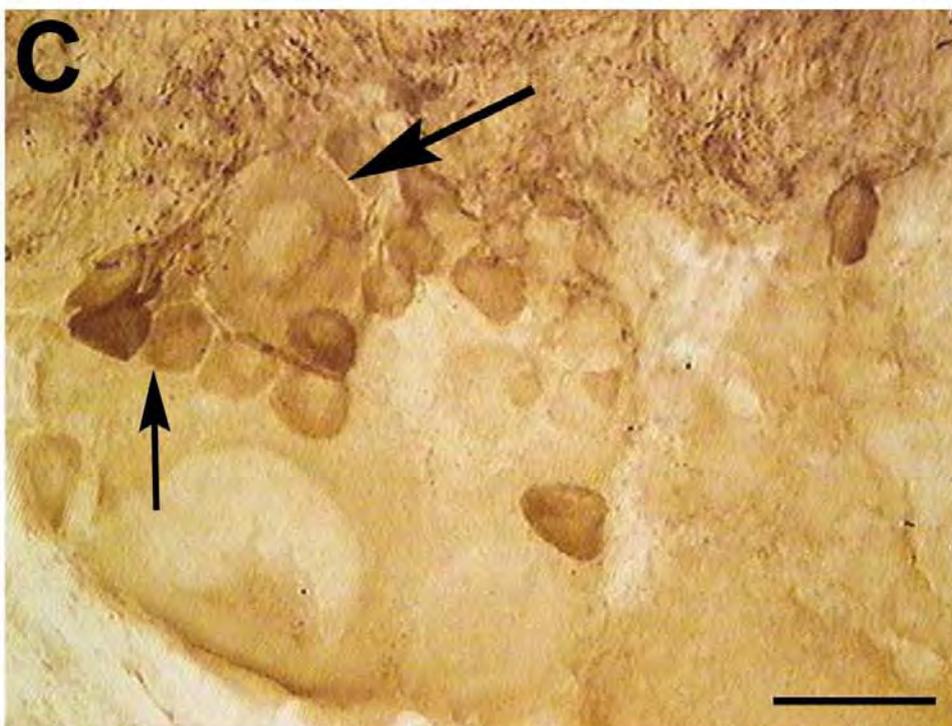
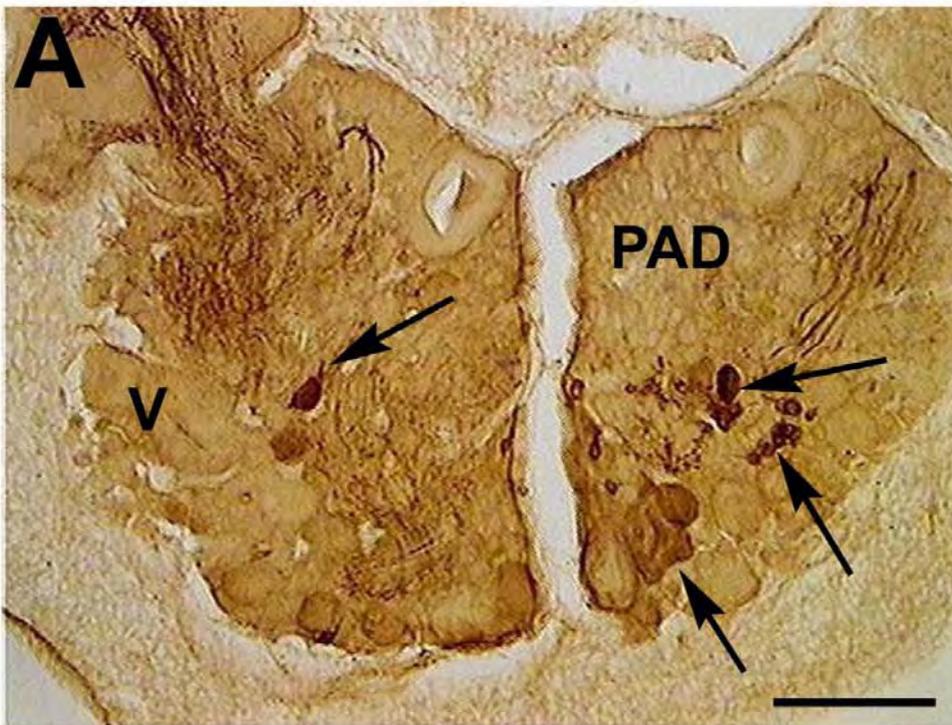
No gânglio visceral pode-se observar um aumento no número de neurônios Fos-ir em relação ao grupo anterior (10%) em regiões póstero-laterais, próximas ao limite com o gânglio parietal direito, bem como em regiões posteriores ao neuropilo, no limite posterior do gânglio (Fig. 42 A e C).



**Figura 40** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus* em animais sacrificados 18 h após o estímulo térmico aversivo. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio visceral; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro; lpe, lobo pedal. Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).



**Figura 41** – Fotomicrografia de secção do hemigânglio cerebral direito ao nível da comissura cerebral (CC) mostrando lobo pleural do pós-cérebro (lpl) sem neurônios Fos-ir. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .



**Figura 42** – Fotomicrografia do complexo parieto-visceral.

**A:** Secção do complexo parieto-visceral do anel subesofagáneo mostrando gânglio parietal direito (PAD) com neurônios Fos-ir de vários tamanhos (setas) e gânglio visceral (V) com neurônios Fos-ir também de diferentes tamanhos (setas). Barra: 400  $\mu$

**B:** Detalhe do gânglio parietal direito mostrando neurônios médios Fos-ir (seta fina), neurônios grandes Fos-ir (seta larga) e neurônio gigante (asterisco). Barra: 160  $\mu$ m.

**C:** Detalhe do gânglio visceral mostrando neurônios médios imunorreativos (seta fina) e um neurônio grande fracamente imunorreativo (seta larga). Barra: 80  $\mu$ m.

#### **4.2.6 – GRUPO 24 HORAS APÓS O ESTÍMULO TÉRMICO AVERSIVO**

Não houve diferença na maioria dos grupos neuronais imunorreativos à c-Fos em relação aos grupos anteriores, apenas o fato de não ter marcação em alguns grupos anteriormente marcados (Fig. 43)

##### **4.2.6.1 – GÂNGLIOS CEREBRAIS**

Nos animais sacrificados 24h após o estímulo térmico aversivo, o mesmo padrão de distribuição neuronal em relação ao grupo anterior (18h) foi identificado nos gânglios cerebrais, apresentando uma pequena redução no número de neurônios Fos-ir (5%) em todas as regiões do gânglio, principalmente no mesocérebro (Fig. 44).

##### **4.2.6.2 – COMPLEXO SUBESOFAGEANO**

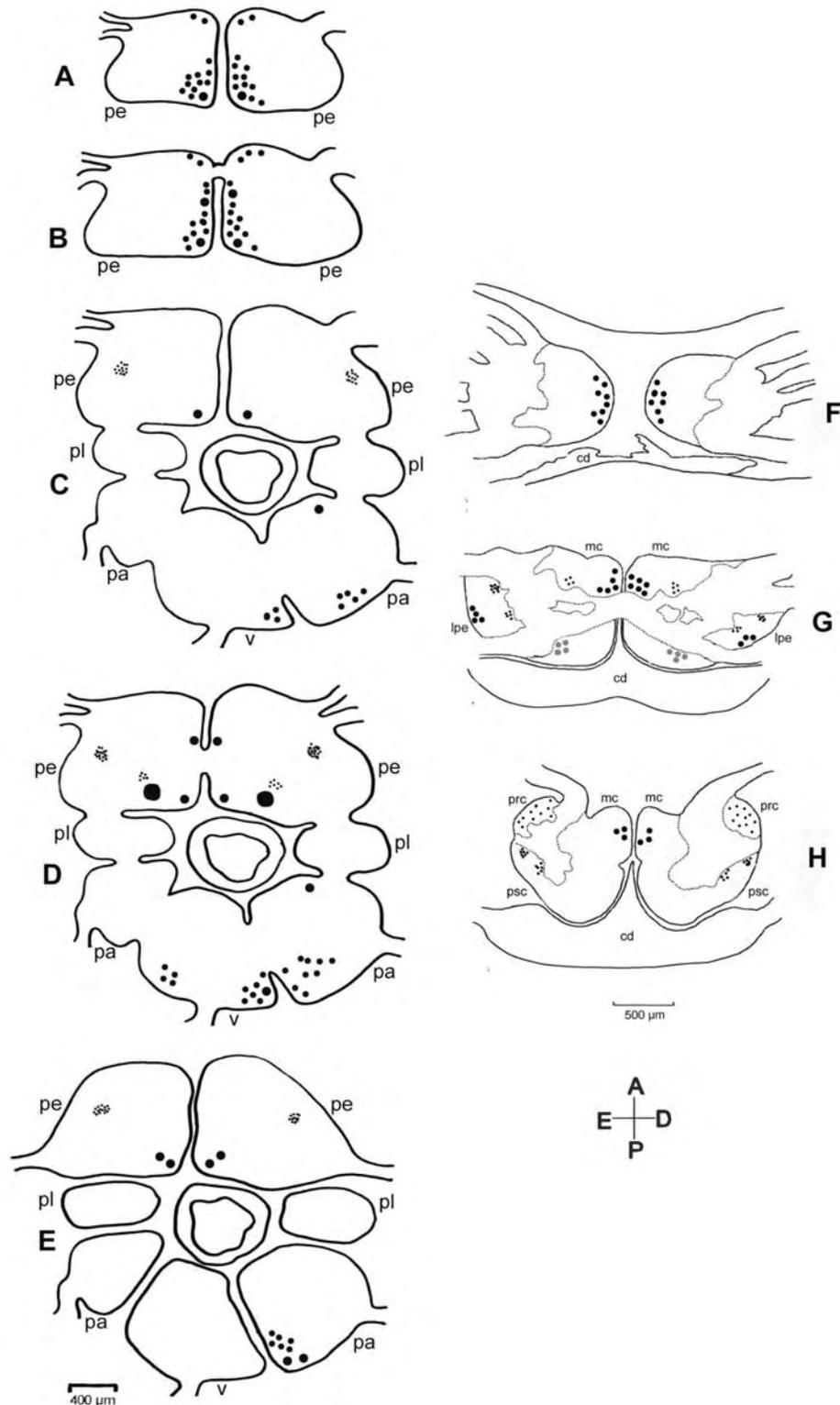
Nos gânglios pedais, na maioria das regiões, tanto em cortes ventrais, mediais e dorsais, o número de neurônios Fos-ir aumentou em relação ao grupo anterior (18h), apresentando aproximadamente 30 células a mais na região medial,

20 células a mais na região posterior, 40 células a mais na região lateral, diminuindo o número de células imunorreativas na região anterior do gânglio.

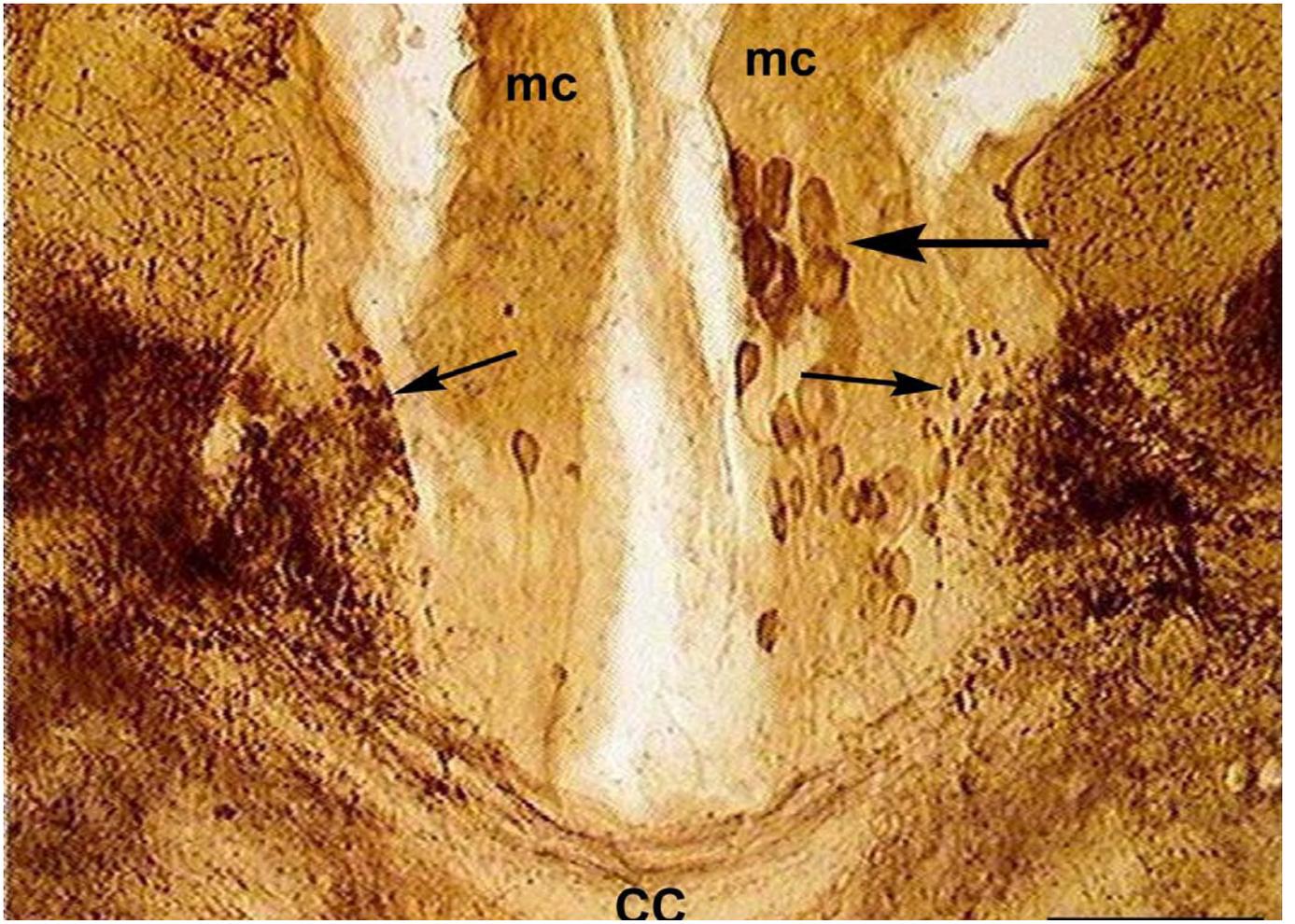
O gânglio parietal apresentou um número menor de neurônios Fos-ir na região posterior ao neuropilo (aproximadamente 20% a menos) em relação ao grupo anterior.

No gânglio visceral também foi observada uma redução no número de neurônios Fos-ir (aproximadamente 20%) em relação ao grupo anterior.

Nenhum neurônio imunorreativo à c-Fos foi encontrado no lobo comissural do pós-cérebro nem nos gânglios pleurais e parietal esquerdo dos animais em todos os grupos experimentais.



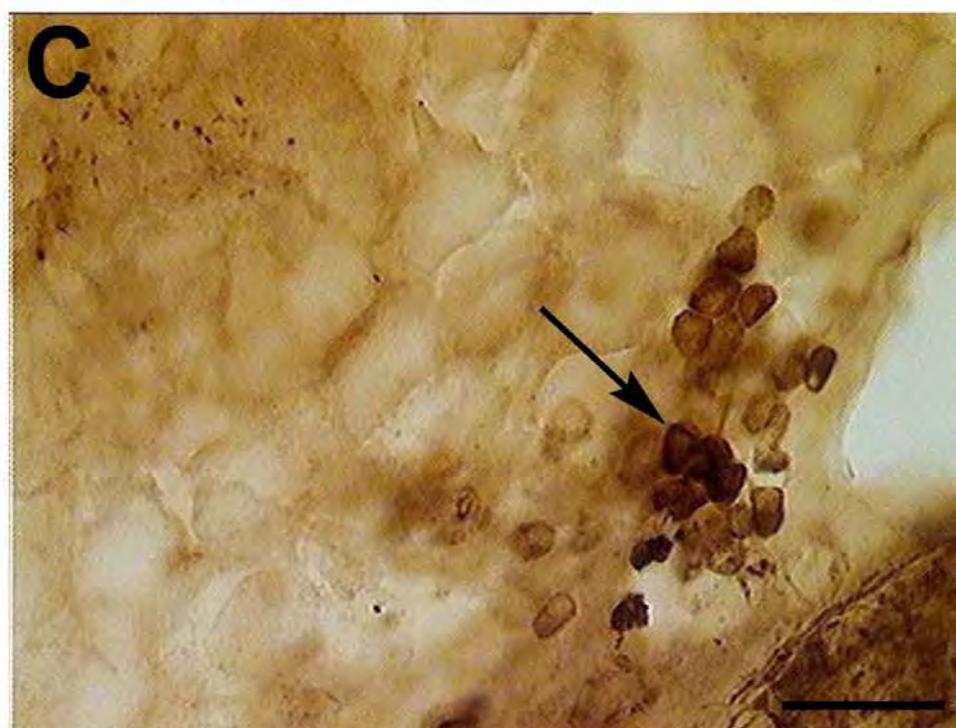
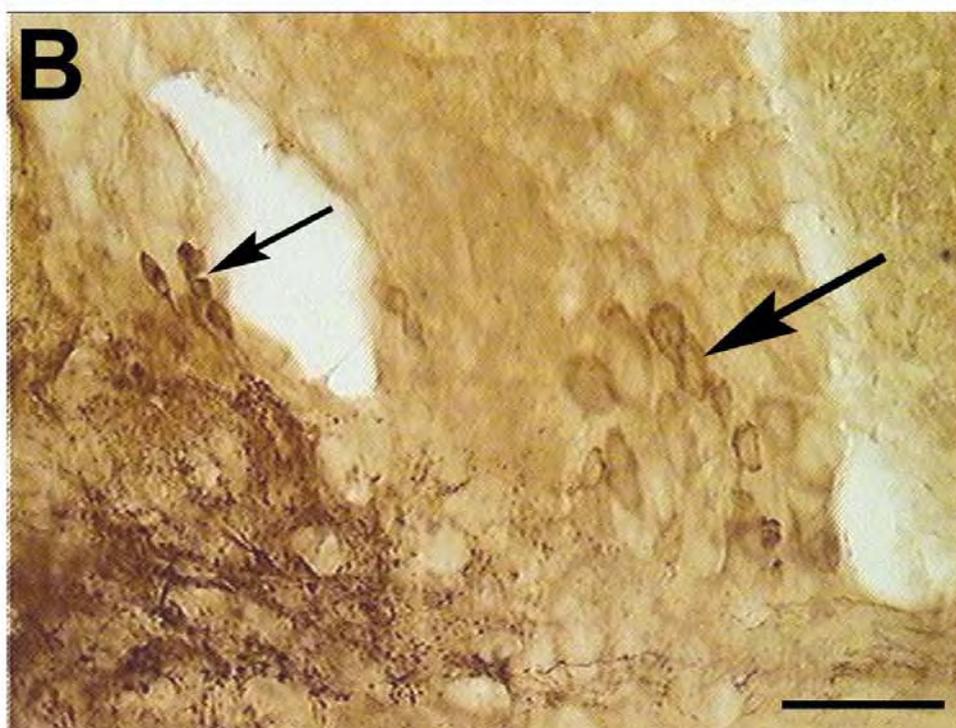
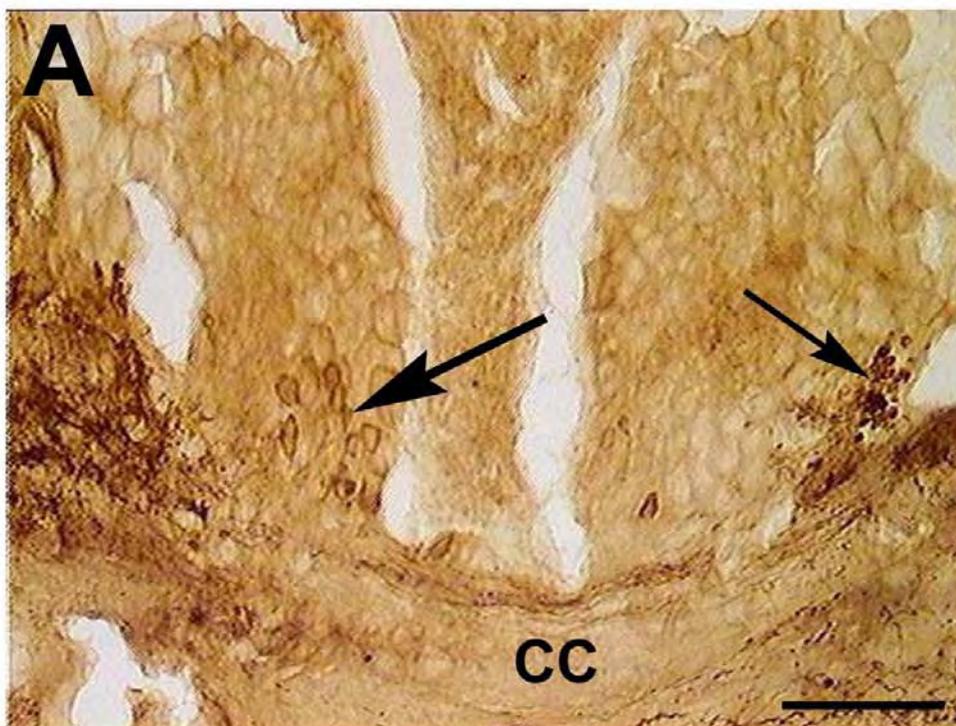
**Figura 43** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus* em animais sacrificados 24 h após o estímulo térmico aversivo. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio visceral; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro; lpe, lobo pedal. Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).



**Figura 44** – Fotomicrografia de secção dos gânglios cerebrais ao nível da comissura cerebral (CC) mostrando região do mesocérebro (mc) com neurônios médios (seta larga) e pequenos (seta fina) Fos-ir. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

### **4.3 – TRATAMENTO COM MORFINA**

Nos animais tratados com salina (1ml) ou morfina (20mg/kg) 15 min antes do estímulo térmico aversivo, os mesmos grupos neuronais nos gânglios do SNC de *M. abbreviatus* mostraram imunomarcção à proteína c-Fos. A observação das secções ganglionares dos animais tratados com salina não demonstrou diferença aparente em relação à quantidade de neurônios Fos-ir em relação aos animais do grupo controle, porém, pode-se identificar uma grande diminuição de células imunorreativas na observação dos gânglios dos animais injetados com morfina (Fig. 45). Mesmo alguns neurônios que se mostraram fortemente imunorreativos nos animais do grupo controle e/ou salina, quando marcados nos gânglios dos animais tratados com morfina, apresentaram uma imunomarcção mais fraca (Fig. 46), embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa em todos os grupos neuronais analisados.

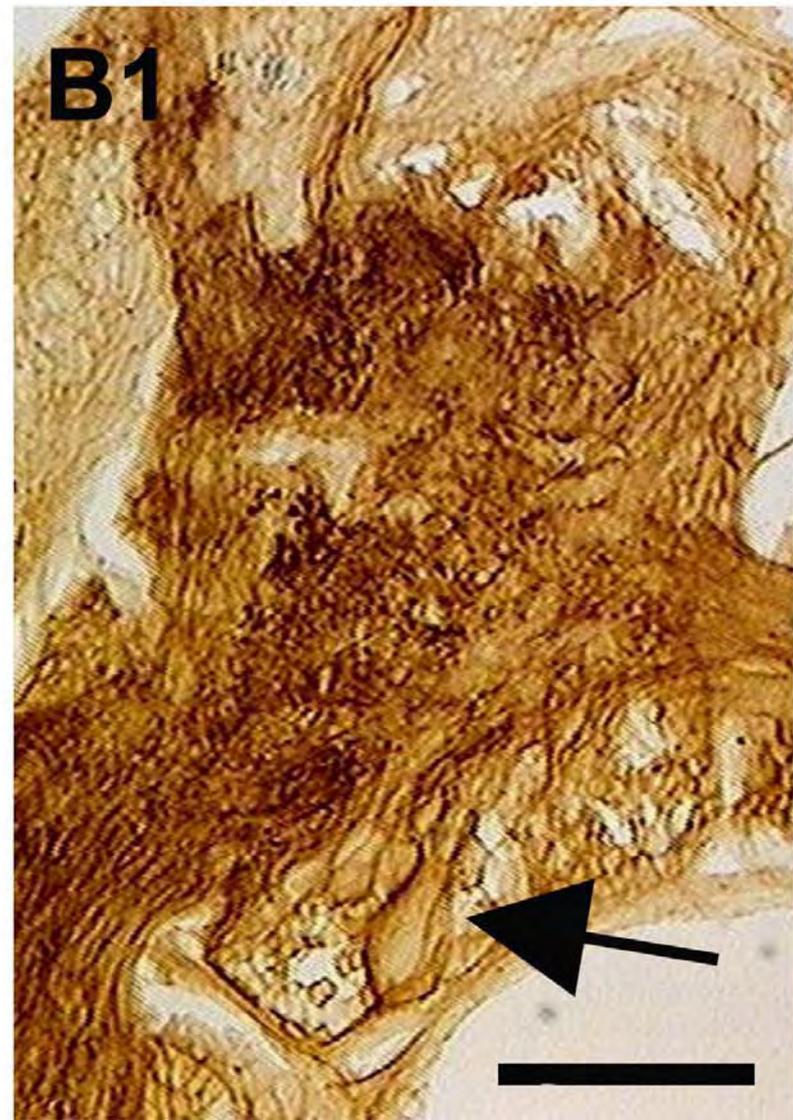
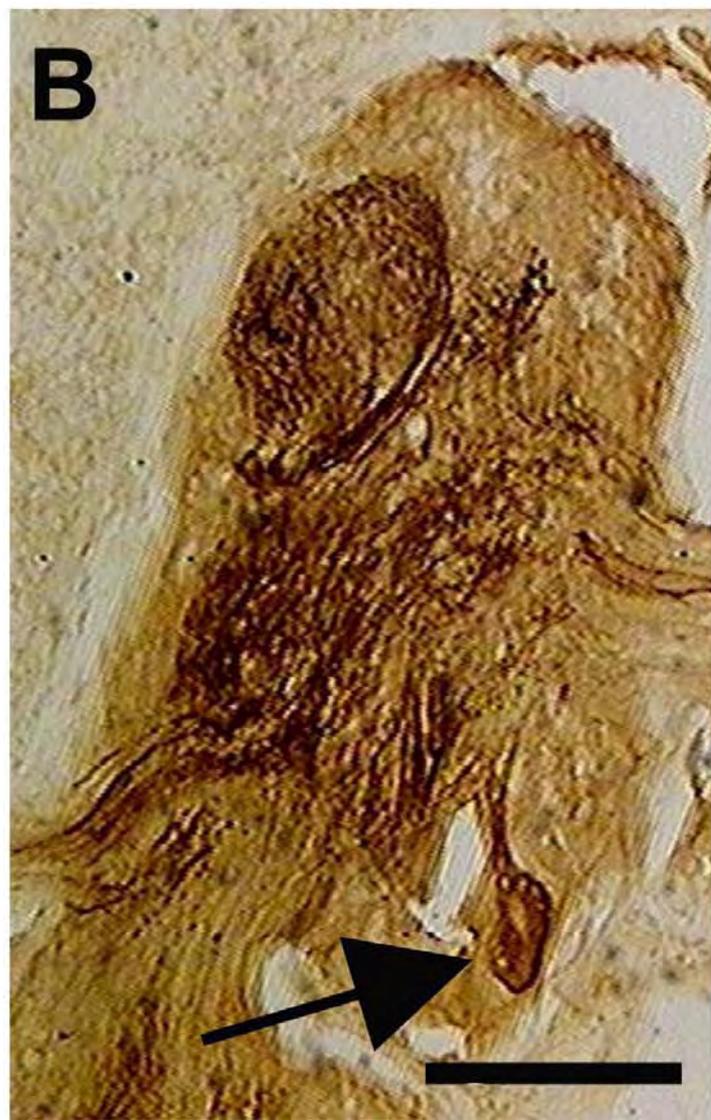
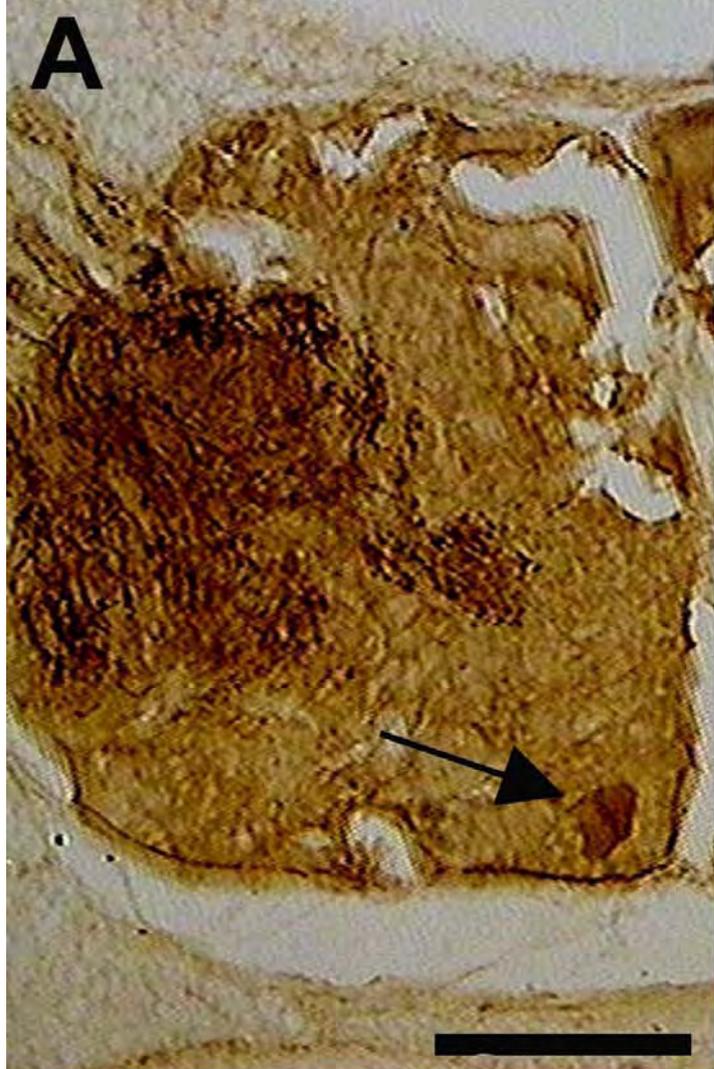


**Figura 45** – Fotomicrografia dos gânglios cerebrais de animais tratados com morfina.

**A:** Secção coronal dos gânglios cerebrais ao nível da comissura cerebral (CC) mostrando região do mesocérebro com neurônios médios (seta larga) e pequenos (seta fina) imunorreativos. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .

**B:** Detalhe dos neurônios médios do mesocérebro (seta larga) indicados pela seta na figura anterior, mostrando uma pequena quantidade de neurônios marcados com uma reação de intensidade média a fraca. Neurônios pequenos Fos-ir (seta fina). Barra: 80  $\mu\text{m}$ .

**C:** Detalhe dos neurônios pequenos do mesocérebro indicados por setas finas nas figuras anteriores, mostrando forte imunorreação. Barra: 160  $\mu\text{m}$ .



**Figura 46** – *Fotomicrografia de secções horizontais dos gânglios pedais.*

**A:** Corte em plano ventral do gânglio pedal de animais controle mostrando neurônio grande Fos-ir na região posterior do gânglio (seta).

**A1:** Corte em plano ventral do gânglio pedal de animais tratados com morfina mostrando o mesmo neurônio grande da região posterior (seta) com fraca imunorreação.

**B:** Corte em plano medial do gânglio pedal de animais controle mostrando neurônio gigante (seta) da região posterior fortemente imunorreativo.

**B1:** Corte em plano medial do gânglio pedal de animais tratados com morfina mostrando o mesmo neurônio gigante posterior (seta) apresentando fraca imunorreatividade.

Barra: 400  $\mu$ m.

#### **4.4 – DENSIDADE ÓPTICA DA IMUNORREATIVIDADE À PROTEÍNA c-FOS**

A análise da imunorreatividade à c-Fos através do método de medida da densidade óptica (DO) revelou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na área do lobo pedal do pós-cérebro do gânglio cerebral em relação às outras regiões analisadas no mesmo gânglio (mesocérebro, pró-cérebro e lobo pleural do pós-cérebro), as quais apresentaram neurônios imunomarcados. Esta diferença na densitometria do lobo pedal do pós-cérebro em relação às demais áreas manteve-se constante em todos os grupos experimentais analisados, apenas não tendo mostrado um aumento significativo em relação ao pró-cérebro em animais sacrificados 24 horas após o estímulo térmico aversivo (Fig. 47). Além disso, também houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) quando comparada a densitometria da região do mesocérebro em relação ao lobo pleural do pós-cérebro nos grupos controle, 3h e 18h (Fig. 47). O lobo pleural do pós-cérebro apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na imunorreatividade da proteína c-Fos quando comparado ao pró-cérebro em animais sacrificados 12h e 24h após o estímulo aversivo (Fig. 47). Em relação ao grupo controle, a DO da proteína c-Fos não variou nos diferentes tempos de sacrifício quando comparada a mesma região do gânglio ao longo do tempo na maioria das regiões. A única diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada no mesocérebro do gânglio de animais sacrificados 12 h após o estímulo térmico aversivo, mostrando uma diminuição da imunorreatividade (Fig. 47).

Quando comparadas as diferentes regiões do gânglio pedal, foi observado um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) na imunorreatividade à proteína c-Fos nos neurônios laterais em relação aos outros grupos neuronais (Fig. 48). Não houve diferença

significativa na DO entre os grupos de neurônios anteriores, mediais e laterais quando comparados entre si, dentro dos mesmos grupos experimentais. A análise de neurônios Fos-ir nos gânglios pedais em diferentes tempos não demonstrou diferença significativa, embora tenha ocorrido um pequeno aumento na imunomarcacão nos neurônios posteriores em 3 h e 6 h, mediais em 6 h e laterais em 12 h (Fig. 48).

No gânglio parietal direito, a análise das diferentes regiões (anterior e posterior) não mostrou nenhuma diferença significativa quando comparadas entre si, embora os neurônios da região posterior ao neuropilo tenham apresentado uma imunorreatividade maior que o grupo neuronal anterior na maioria dos grupos. Quando comparado o mesmo grupo neuronal nos diferentes grupos experimentais, nota-se um leve aumento na DO nos grupos neuronais anterior e posterior em 3 h, 6 h e 12 h, embora esta diferença não seja significativa (Fig. 49).

No gânglio visceral, houve também um pequeno aumento na imunorreatividade à proteína c-Fos nos grupos de neurônios presentes nesta estrutura nos animais sacrificados 6 h após e estímulo térmico aversivo, porém esta diferença não foi significativa quando comparada com os demais grupos experimentais (Fig. 50).

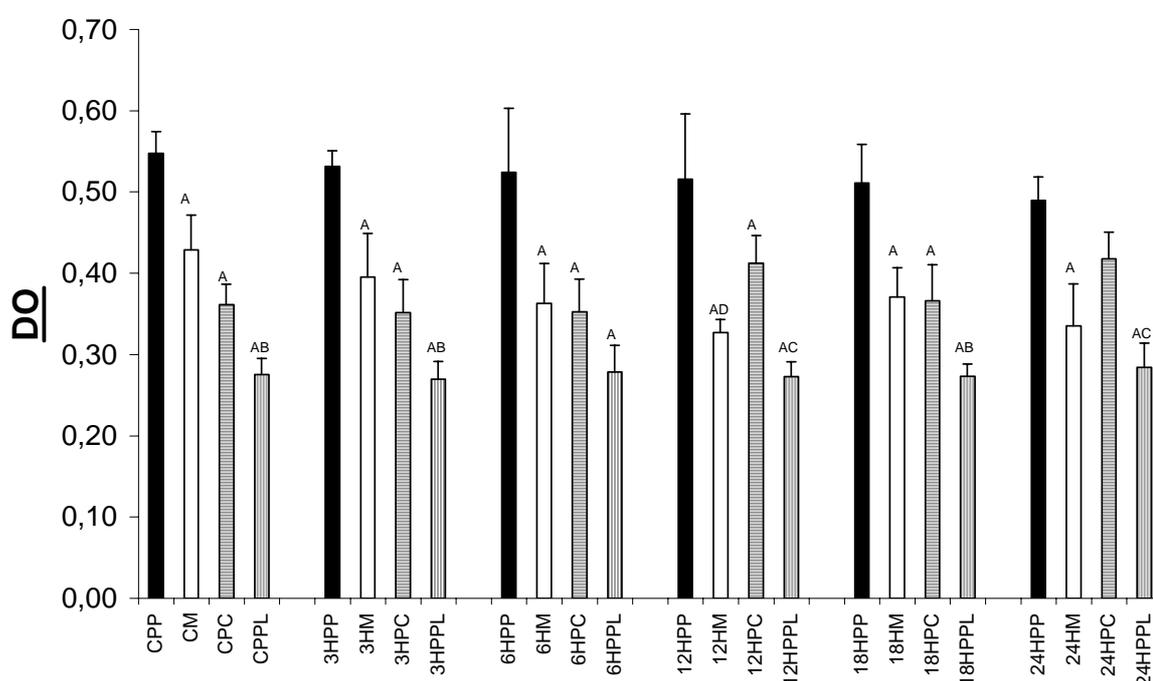
Nos grupos cujos animais foram pré-tratados com salina ou morfina 15 min antes do estímulo térmico aversivo, os mesmos grupos neuronais foram analisados em todos os gânglios do SNC de *M. abbreviatus*. A análise dos grupos injetados com salina quando comparados com o grupo controle, revelou um pequeno aumento da imunorreatividade à c-Fos, sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ) no lobo pedal do pós-cérebro de animais sacrificados 6 h após o estímulo aversivo (Fig. 51 B), nos neurônios mediais do gânglio pedal dos grupos experimentais 3 h e 12 h

(Fig. 52, B), nos neurônios laterais do gânglio pedal dos grupos 3 h e 24 h (Fig. 52 D), nos neurônios anteriores do gânglio parietal direito de animais sacrificados 3 h, 6 h e 12 h após o estímulo (Fig. 53 A), nos neurônios posteriores do gânglio parietal direito dos animais sacrificados 12 h e 18 h após o estímulo aversivo (Fig. 53 B), e no gânglio visceral dos grupos de animais sacrificados 6 h e 12 h após o estímulo térmico aversivo (Fig. 54).

Quando se observaram os efeitos da injeção de morfina na imunorreatividade da proteína c-Fos nos diferentes grupos neuronais, a comparação foi feita em relação ao grupo controle e em relação ao grupo salina de animais sacrificados ao mesmo tempo após o estímulo. Em relação ao grupo controle, observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) na DO da imunorreatividade da proteína c-Fos nos neurônios anteriores do gânglio pedal nos animais sacrificados 3 h e 6 h após o estímulo térmico aversivo (Fig. 52 A) e nos neurônios laterais do gânglio pedal dos animais sacrificados 3 h após o estímulo (Fig. 52 D). No momento em que a comparação foi feita entre os grupos salina e morfina de animais sacrificados ao mesmo tempo, na grande maioria dos grupos observou-se uma diminuição na imunorreatividade da proteína c-Fos. Esta diminuição, porém, mostrou-se significativa ( $p < 0,01$ ) na região do mesocérebro de animais do grupo 3 h (Fig. 51 A), na região do lobo pedal do pós-cérebro de animais dos grupos 3 h, 6 h e 18 h (Fig. 51 B), nos neurônios anteriores do gânglio pedal nos grupos 6 h e 12 h (Fig. 52 A), nos neurônios mediais do gânglio pedal do grupo 3 h (Fig. 52 B), nos neurônios posteriores do gânglio pedal do grupo 6 h (Fig. 52 C), na região anterior do gânglio parietal direito de animais do grupo 12 h (Fig. 53 A) e nos neurônios do gânglio visceral no grupo experimental 12 h (Fig. 54). Houve uma diminuição na DO da proteína c-Fos extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) nos neurônios mediais do

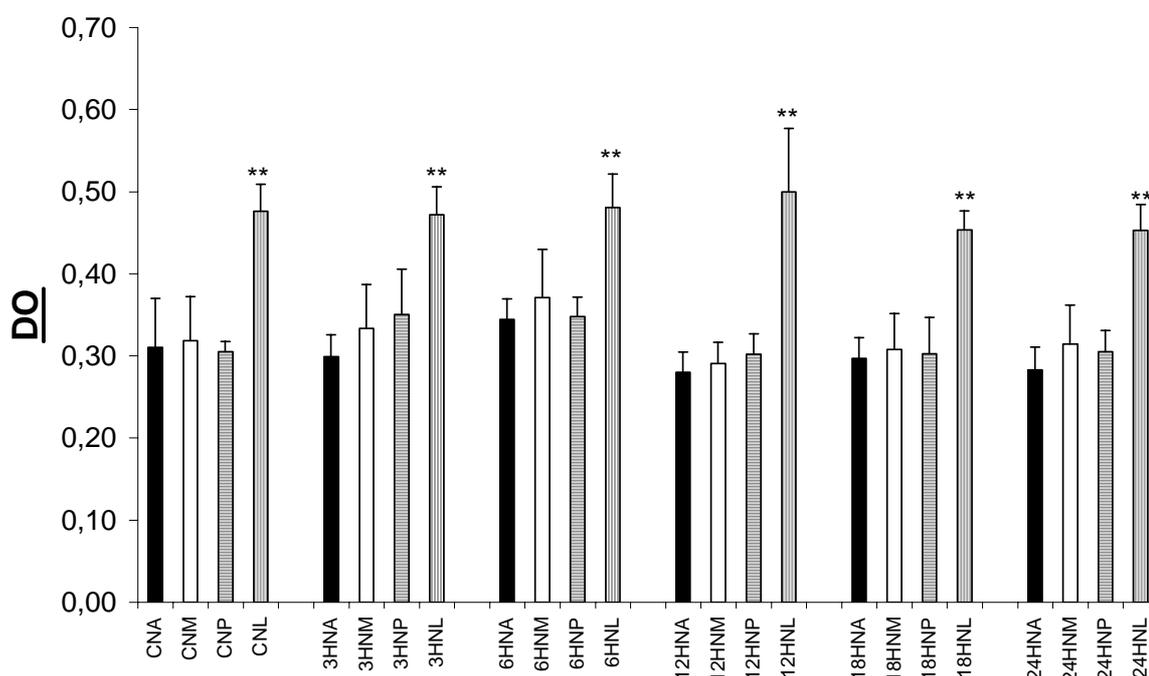
gânglio pedal de animais sacrificados 12 h após o estímulo térmico aversivo (Fig. 52 B), nos neurônios posteriores do gânglio pedal dos animais sacrificados 12 h após o estímulo (Fig. 52 C) e nos neurônios do gânglio visceral dos animais do grupo experimental 6 h (Fig.54).

## GÂNGLIO CEREBRAL



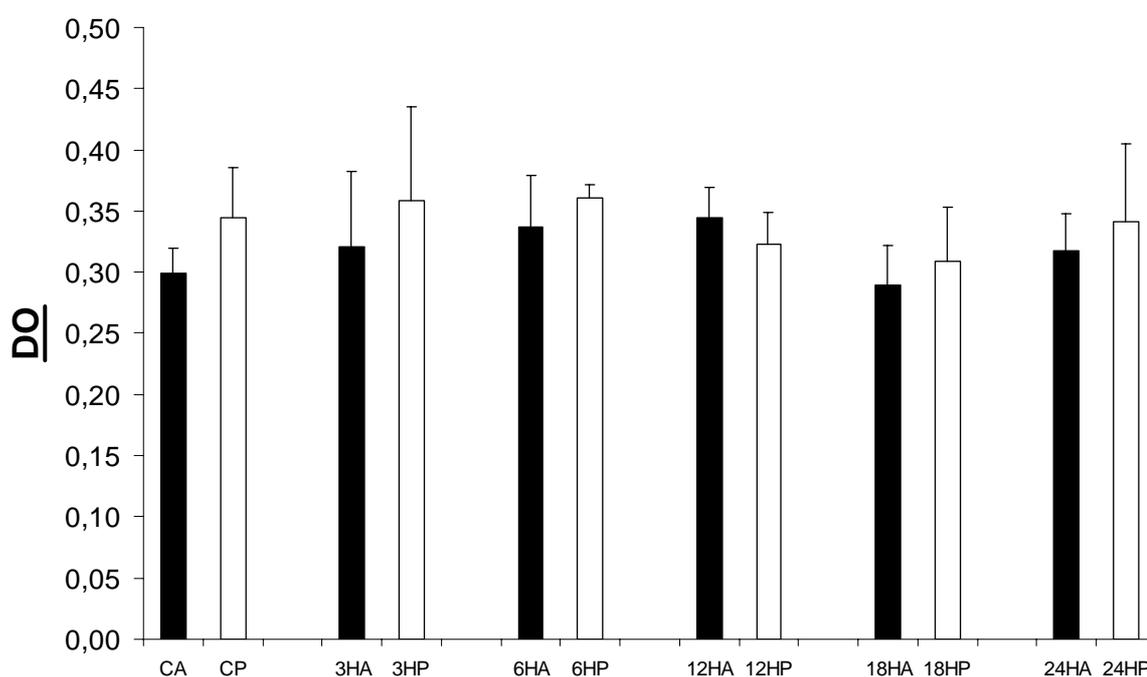
**Figura 47** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c-Fos em diferentes regiões do gânglio cerebral de animais controle (C) e submetidos ao estímulo térmico aversivo, sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). A:  $p < 0,05$  quando comparados com o lobo pedal do pós cérebro (PP); B:  $p < 0,05$  quando comparados com o mesocérebro (M); C:  $p < 0,05$  quando com o pró-cérebro (PC). D:  $p < 0,05$  quando comparada a mesma região do gânglio ao longo do tempo em relação ao grupo controle. Lobo pleural do pós-cérebro (PPL). (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Bonferroni).

## GÂNGLIO PEDAL

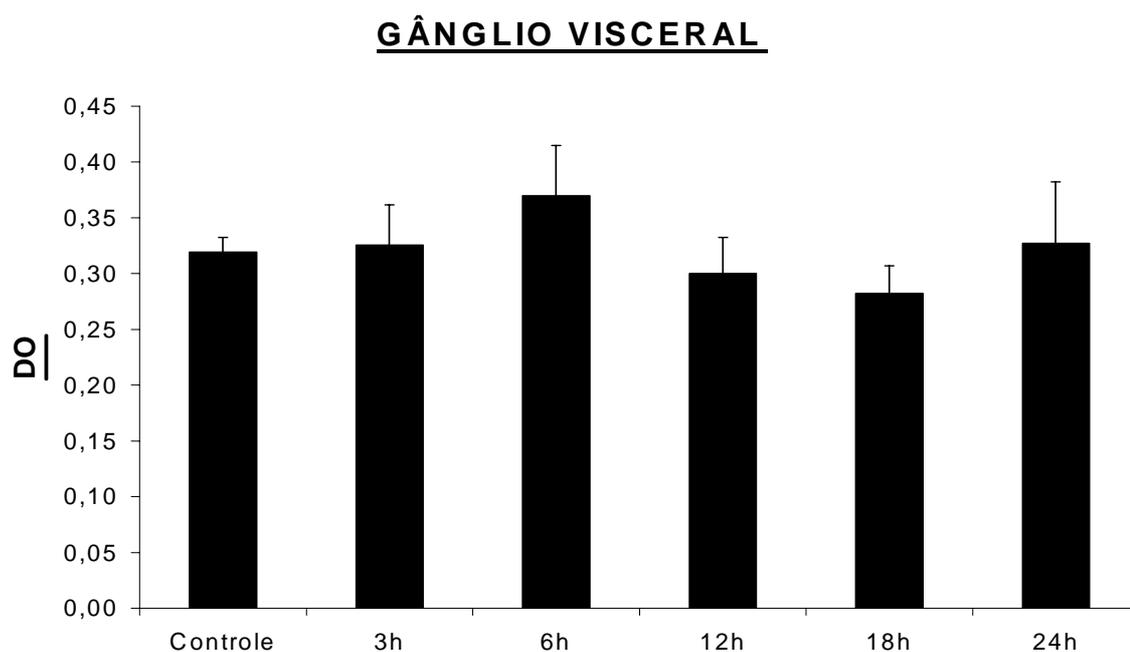


**Figura 48** – Análise da densidade óptica (DO) da imunoreatividade da proteína c-Fos em diferentes regiões do gânglio pedal de animais controle (C) e submetidos ao estímulo térmico aversivo, sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). Observa-se diferença significativa (\*\* $p < 0,01$ ) na expressão da proteína c-Fos apenas nos neurônios laterais (NL) em relação aos outros grupos neuronais de animais pertencentes ao mesmo grupo. Neurônios anteriores (NA), neurônios mediais (NM), neurônios posteriores (NP). (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Benferroni).

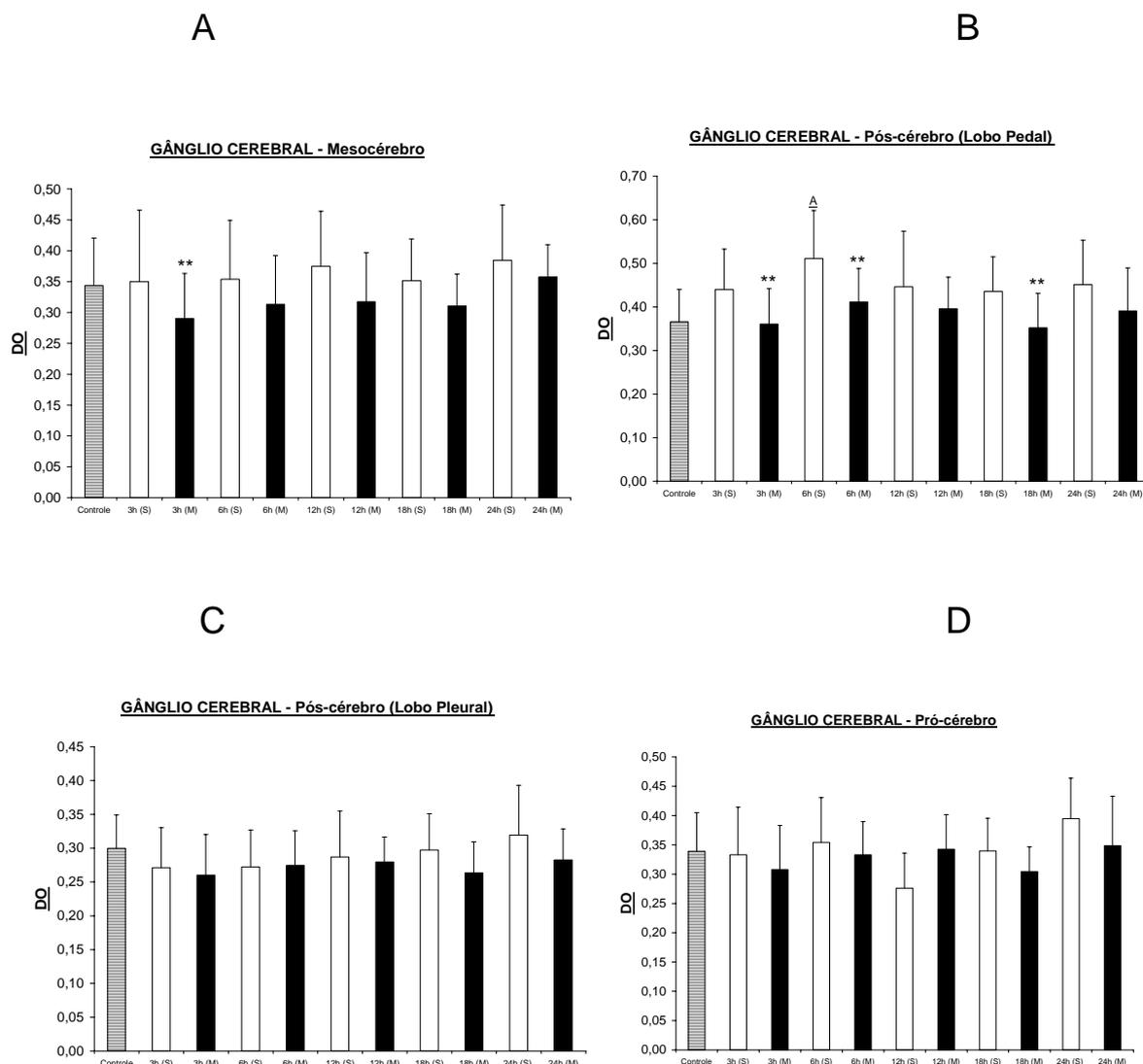
## GÂNGLIO PARIETAL DIREITO



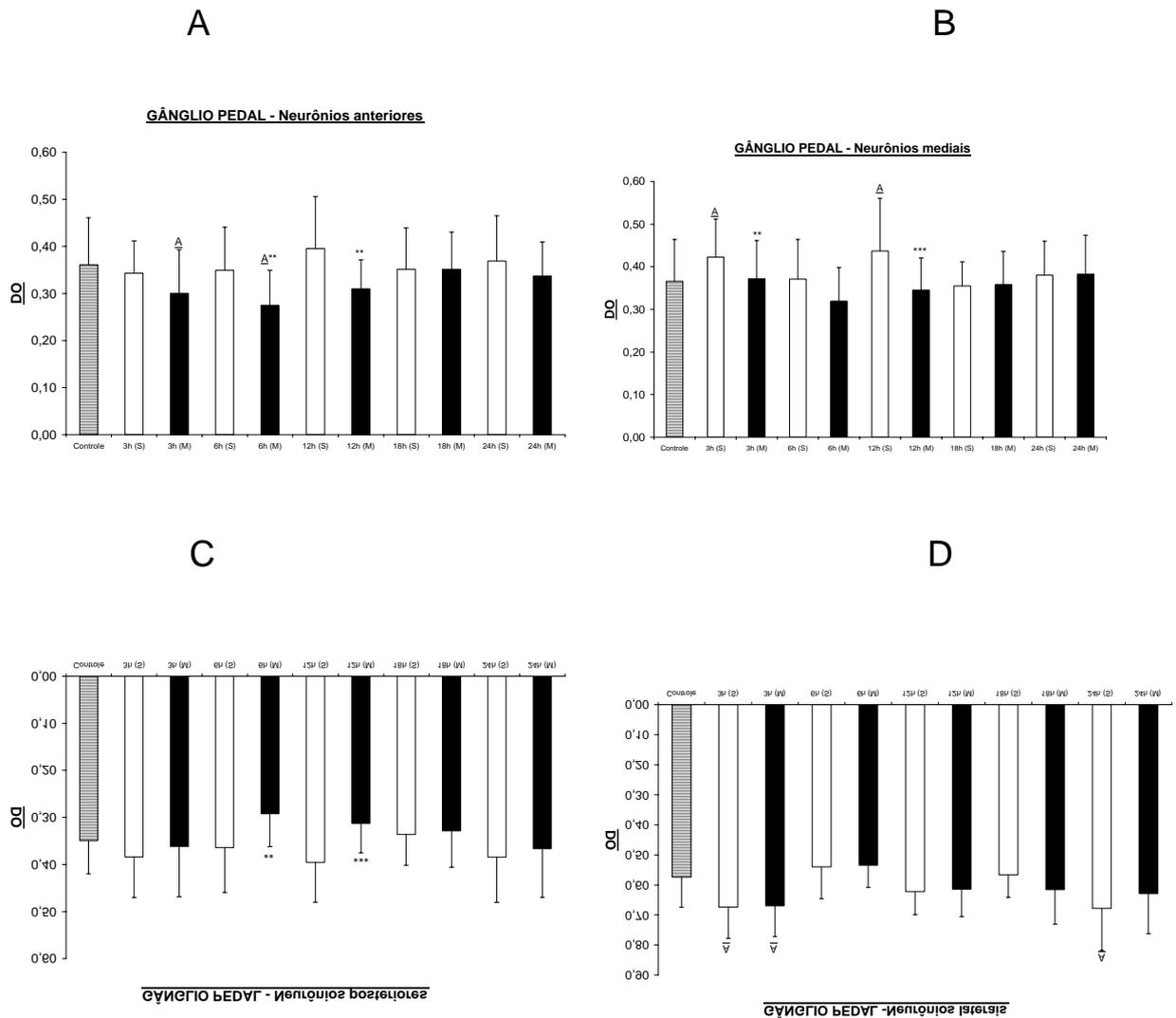
**Figura 49** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c- Fos nas regiões anterior (A) e posterior (P) do gânglio parietal direito de animais controle (C) e de animais submetidos ao estímulo térmico aversivo e sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). Nenhuma diferença significativa foi encontrada. (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Benferroni).



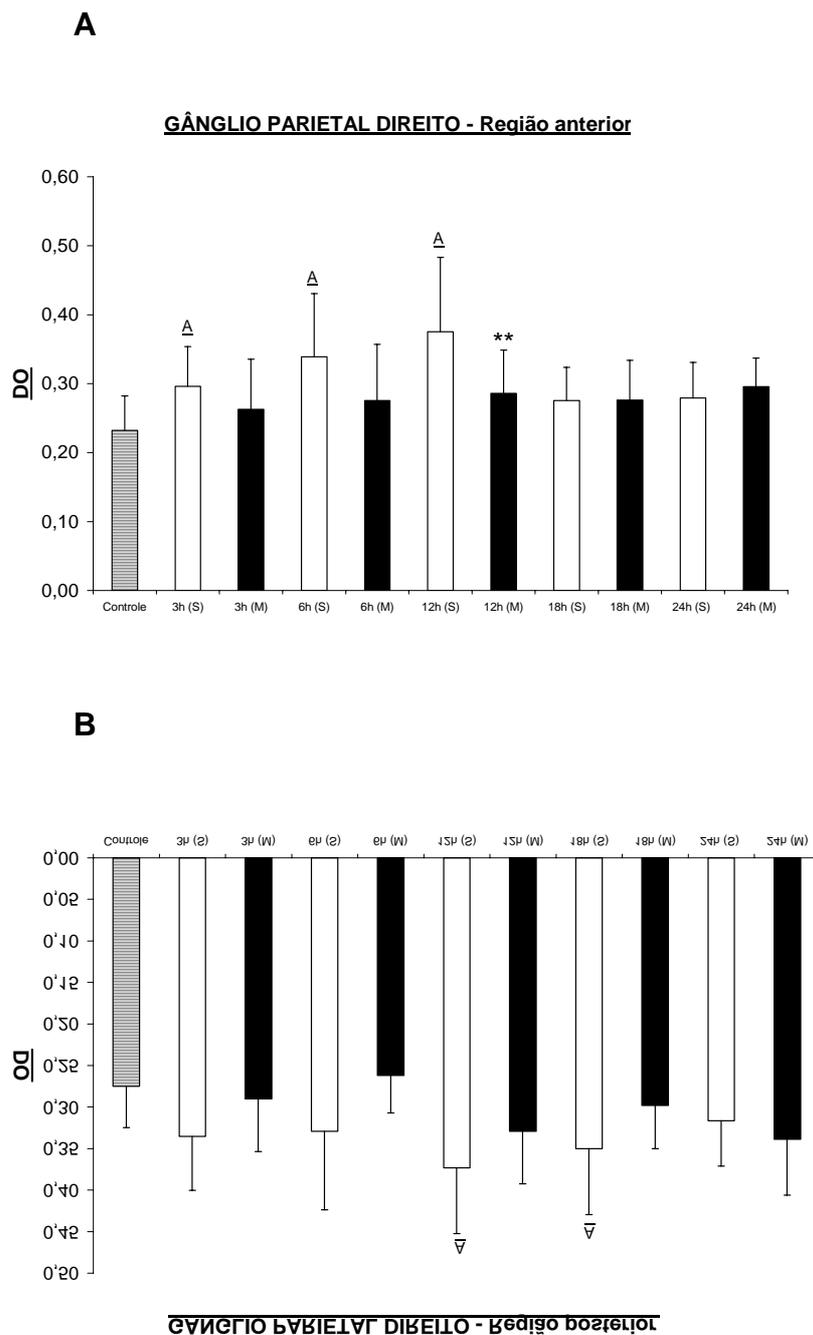
**Figura 50** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c-Fos no gânglio visceral de animais controle e submetidos ao estímulo térmico aversivo e sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). Não houve diferença significativa. (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Bonferroni).



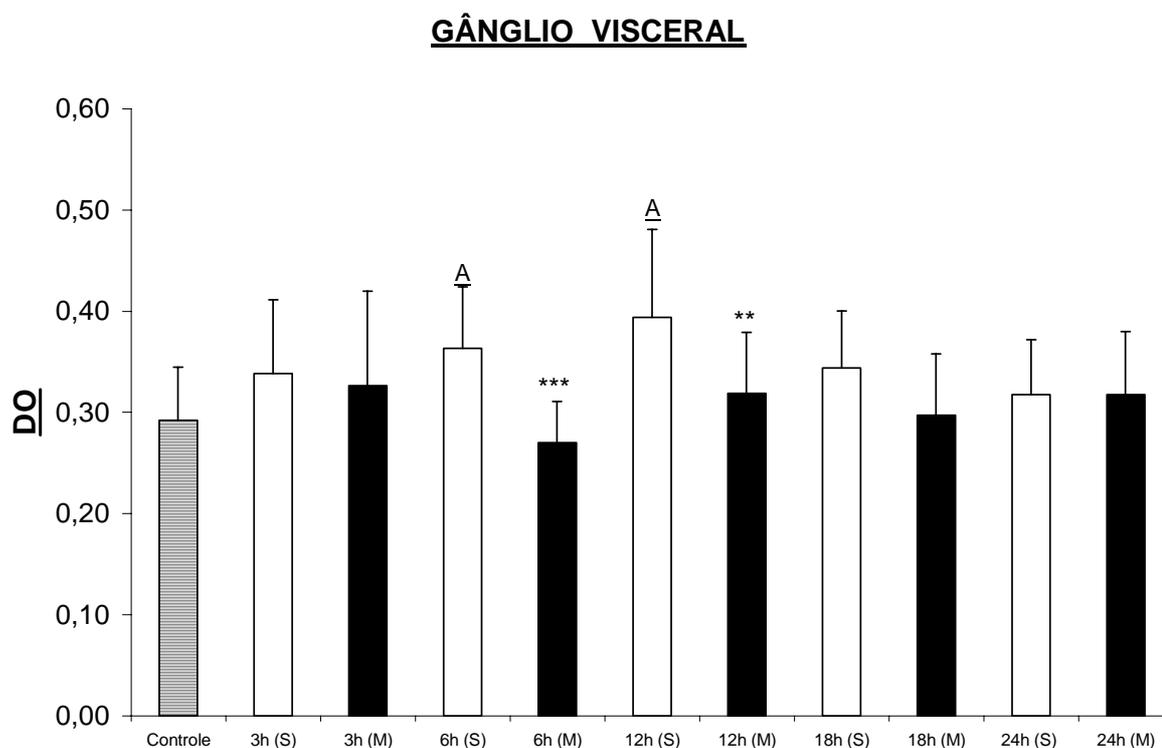
**Figura 51** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c-Fos nas diferentes regiões do gânglio cerebral de animais controle ou pré-tratados com salina (S) ou com morfina (M) antes de serem submetidos do estímulo térmico aversivo, sacrificados em diferentes tempo (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). A: diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle; \*\*( $p < 0,01$ ) diferença significativa quando comparado com o grupo salina no mesmo tempo de sacrifício. (ANOVA de uma via e post hoc de Bonferroni).



**Figura 52** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c-Fos nas diferentes regiões do gânglio pedal de animais controle e pré-tratados com salina (S) ou com morfina (M) antes de serem submetidos ao estímulo térmico aversivo, sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). A: diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle; \*\* ( $p < 0,01$ ) e \*\*\* ( $p < 0,001$ ) diferença significativa quando comparado com o grupo salina no mesmo tempo de sacrifício (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Bonferroni).



**Figura 53** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c-Fos nas diferentes regiões do gânglio parietal direito de animais controle e pré-tratados com salina (S) ou com morfina (M) antes de serem submetidos ao estímulo térmico aversivo, sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H e 24H). A: diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controle; \*\* ( $p < 0,001$ ) diferença significativa quando comparado com o grupo salina no mesmo tempo de sacrifício (ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Bonferroni)



**Figura 54** – Análise da densidade óptica (DO) da imunorreatividade da proteína c-Fos no gânglio visceral de animais controle e pré-tratados com salina (S) ou com morfina (M) antes de serem submetidos ao estímulo térmico aversivo, sacrificados em diferentes tempos (3H, 6H, 12H, 18H, 24H). A: diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o grupo controle; \*\*( $p < 0,01$ ) e \*\*\*( $p < 0,001$ ) diferença significativa quando comparado com o grupo salina no mesmo tempo de sacrifício. (ANOVA de uma via e teste post hoc de Bonferroni).

## 5 – DISCUSSÃO

A distinção entre dor e nocicepção é fundamental para o entendimento adequado dos sistemas sensoriais envolvidos nestes fenômenos. O termo dor se aplica melhor a seres humanos, sendo esta uma experiência múltipla em que a nocicepção representa seu componente sensorial (BASBAUM & JESSEL, 2000). O termo nocicepção tem sido definido como a habilidade dos animais de responderem a estímulos ambientais aversivos e sua capacidade de detectar e reagir a este estímulo, o qual pode comprometer sua integridade. Isso implica na presença de receptores que informam a natureza aversiva do estímulo, e de efetores, que respondem a aferências sensoriais e produzem respostas comportamentais reflexas, mediadas por neurotransmissores (KAVALIERS, 1988a).

A função melhor caracterizada dos neurotransmissores é na regulação da comunicação transsináptica no SNC e no SNP, porém eles também participam da regulação de mudanças de longa duração nas propriedades neurais e em células pós-sinápticas. Isso é conseguido pela regulação transsináptica da expressão de genes específicos (GREENBERG *et al.*, 1986; GOELLET *et al.*, 1986). Uma célula responde a moléculas sinalizadoras por meio de uma resposta integrada que resulta de um acoplamento do estímulo extracelular à via efetora intracelular. Existem evidências de que os estímulos nocivos podem também produzir variações de longa duração nos processos celulares no SNC, através da modulação da expressão dos genes de ativação imediata, como o c-fos (PRADO & DEL BEL, 1998).

O protooncogene fos codifica um fator de transcrição, a proteína c-Fos, que é induzida por estímulos ambientais. Sua função é acoplar sinais de curta duração recebidos na superfície celular a alterações de longa duração no fenótipo celular, pela regulação de genes-alvo específicos. Na maioria dos tipos celulares de mamíferos, os níveis basais do RNAm do gene c-fos e a expressão da proteína c-Fos são relativamente baixos, embora existam algumas circunstâncias excepcionais nas quais as células mantêm níveis relativamente altos de expressão. Nesses tipos celulares, sinais extracelulares são necessários constantemente para manter níveis elevados de expressão. Uma das características do gene c-fos que sugeriu que este poderia estar envolvido no processo de sinalização foi a descoberta de que a sua expressão poderia ser transitoriamente induzida a níveis muito altos por soro e fatores de crescimento. Está agora estabelecido que muitos tipos de estímulos, alguns associados com o processo de diferenciação e alguns ligados à excitação neuronal, provocam uma indução transitória muito similar do RNAm c-fos e da proteína c-Fos (MORGAN & CURRAN, 1991).

Muitos estudos têm sido feitos, mostrando que vários tipos de estimulação nociva, incluindo estímulos mecânicos, químicos e térmicos, induzem a expressão de c-fos no encéfalo e na medula espinhal de mamíferos. Na maioria destes estudos, a expressão do gene c-fos foi simplesmente aplicada como um marcador funcional para identificar a atividade em neurônios espinhais em resposta à estimulação nociva, estabelecendo também onde a nocicepção é modulada por uma dada manipulação. Cada um destes estudos têm confirmado a relação entre nocicepção e expressão de c-fos, adicionando evidências que estabelecem este gene e seu produto protéico como uma útil ferramenta para o estudo de correlatos neurais (HARRIS, 1998).

O mapeamento da imunorreatividade à proteína c-Fos no SNC de mamíferos tem revelado sua localização nuclear (DRAGUNOW *et al.*, 1987; MENÉTREY *et al.*, 1989; BULLIT, 1990; MORGAN & CURRAN, 1991; TÖLLE *et al.*, 1991; JENNINGS & FITZGERALD, 1996; BOT & CHAHL, 1996; KOVÁCS, 1998), onde ela está envolvida na regulação da expressão de genes-alvo através de sua ligação ao sítio regulatório AP-1 do DNA. Embora a localização da proteína c-Fos seja predominantemente nuclear em áreas do encéfalo e da medula espinhal de mamíferos, uma imunorreação muito fraca também já foi detectada no citoplasma de células cerebrais (DRAGUNOW & ROBERTSON, 1988).

Quanto à imunorreatividade da proteína c-Fos nos neurônios de *M. abbreviatus*, esta foi detectada com localização predominantemente citoplasmática e em axônios, porém com poucos grânulos pardos em posição nuclear. Em *Rana esculenta*, uma hipótese para explicar a presença de imunorreatividade à proteína c-Fos no citoplasma de células nervosas em determinadas estações do ano é a ocorrência de um provável estoque de fatores de transcrição no citoplasma celular por longos períodos antes da translocação nuclear. Provavelmente isso ocorra pelo fato destes animais serem ectotérmicos e apresentarem períodos reprodutivos sazonais. Além disso, nestes animais experimentos foram feitos para confirmar a presença também da proteína c-Jun no citoplasma destas células com imunorreatividade citoplasmática à c-Fos. Os resultados obtidos sugerem que a proteína c-Fos citoplasmática está ligada à proteína c-Jun, com a qual a dimerização é necessária para a ligação ao sítio AP-1 do DNA (COBELLIS *et al.*, 1999).

Talvez isso também possa estar ocorrendo com a espécie de caracol em estudo, onde a proteína c-Fos possa apresentar uma localização celular variável conforme a

estação do ano em que os animais são coletados, o que poderia apresentar uma distribuição semelhante a estes anfíbios, onde ora a proteína predomina no núcleo, ora no citoplasma e em determinados momentos em ambos os compartimentos celulares e em outros momentos ela sequer é detectada (COBELLIS *et al.*, 1999). Nossos experimentos foram realizados em animais coletados somente nos meses de janeiro e junho. Caberia a realização de um experimento que monitorasse a expressão da proteína c-Fos ao longo do ano, com coletas e experimentos mensais para certificar-nos da possível ocorrência da variação sugerida. Porém, nossos resultados estão de acordo com aqueles obtidos em *Cepaea nemoralis*, onde a imunistoquímica para os produtos de reação de genes precoces imediatos, como o c-jun, não foi restrita ao núcleo, mas apareceu no citoplasma do corpo celular e inclusive nos neuritos. Tais achados também vão ao encontro de registros que têm sido feito em peixes teleósteos, abelhas, gafanhotos e besouros, mas diferem na localização da imunorreação encontrada em mamíferos, que é restrita ao núcleo. Especulações a respeito da razão para esta diferença são prematuras, mas até o que se sabe, ela pode ser manifesto de uma tendência evolutiva, uma vez que estudos comparativos sugerem que c-fos e c-jun podem ser antigos em termos evolutivos, e suas seqüências preservadas em muitos filos animais (DYAKONOVA *et al.*, 1999).

Também confirmando nossos resultados, estudos realizados em anfíbios (COBELLIS *et al.*, 1999; ROSSATO, comunicação pessoal) têm revelado que a localização nuclear da proteína c-Fos não é um dogma, uma vez que nesses trabalhos a imunorreatividade a esta proteína foi detectada também no citoplasma de neurônios.

Em insetos, neurônios Fos-ir foram identificados no SN de abelhas (FONTA *et al.*, 1995) e *Drosophila* (RIESE *et al.*, 1997; PERKINS *et al.*, 1988). Em abelhas, a imunorreatividade à c-Fos não foi observada em todas as populações neuronais, mas restrita a algumas delas. Além disso, através da comparação com corante específico para marcação nuclear, a proteína c-Fos apareceu localizada no citoplasma das células (FONTA *et al.*, 1995). Em *Drosophila*, tem-se demonstrado que o sítio de ligação AP-1 do DNA reconhece os mesmos ligantes, com afinidades similares, que o sítio AP-1 de humanos, além de possuírem propriedades de ativação transcricional em comum (PERKINS *et al.*, 1988). A detecção imunohistoquímica de D-Fos, o homólogo de c-fos em *Drosophila*, revelou uma localização predominantemente, senão exclusivamente, nuclear em todos os tipos de células observadas, em experimentos de desenvolvimento deste inseto (RIESE *et al.*, 1997), reforçando sua homologia com a proteína c-Fos de mamíferos e sua provável atuação no núcleo celular, regulando a expressão de genes-alvo que, neste caso, estão envolvidos na diferenciação embrionária.

Ainda em invertebrados, estudos em outros moluscos também foram realizados para detectar o envolvimento tanto do gene c-fos (GRINKEVICH *et al.*, 1997) quanto da família proteínas Fos (OTTAVIANI *et al.*, 1999) em diferentes processos celulares. O estudo realizado por OTTAVIANI e cols. (1999) em imunócitos do molusco *Mytilus galloprovincialis*, através de imunocitoquímica, revelou uma reação positiva no núcleo de todas as células quando utilizado anticorpo policlonal contra Fos-B, ao passo que o citoplasma manteve-se negativo. Tal experimento foi realizado com imunócitos após serem cultivados com fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e com fator  $\beta$  de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), que promovem a transcrição de c-Fos após ligarem-se a

receptores com atividade tirosina quinase ou serina/treonina quinase, respectivamente. A observação do SNC do caracol *Helix* revelou a presença do gene c-fos, e sua expressão foi significativamente maior durante o aprendizado. Vários registros têm demonstrado a possibilidade de que a expressão do gene é regulada durante o aprendizado por um mecanismo similar aos mecanismos de diferenciação e proliferação celular, ou seja, por uma resposta bifásica incluindo a expressão de genes precoces imediatos, tais como c-fos, que poderia regular a via das proteínas quinases A e C, segundos mensageiros que exercem importantes papéis na plasticidade de respostas defensivas de moluscos. Análise de hibridização por eletroforese em gel de agarose mostrou um aumento de aproximadamente duas vezes na quantidade do RNAm de c-fos em caracóis submetidos a estímulos condicionados e não condicionados, quando comparados com os animais controle. Estes dados sugerem o envolvimento do gene c-fos nos processos moleculares responsáveis pela plasticidade das respostas defensivas de moluscos (GRINKEVICH *et al.*, 1997).

A ativação transcricional do gene c-fos em mamíferos ocorre dentro de 5 min e continua por 15-20 min. O RNAm acumula-se no citoplasma e atinge um pico aproximadamente 30-45 min após a estimulação. O pico do nível da proteína c-Fos codificada ocorre cerca de 2 h após a indução da transcrição do gene (MORGAN & CURRAN, 1991; NARANJO *et al.*, 1991; HARRIS, 1998). Na espécie de caracol estudada, este pico parece ocorrer mais tarde, aproximadamente em 6 h após o estímulo, sugerindo um mecanismo mais lento de indução da expressão desta proteína nestes animais. Além disso, tem sido demonstrado que no encéfalo e testículos de anfíbios, onde ocorre uma expressão crônica de c-Fos, a atividade do gene parece não estar restrita a períodos tão curtos quanto os descritos para

mamíferos, sendo que em vertebrados não mamíferos este tempo de expressão deve ser mais longo (COBELLIS *et al.*, 1999), indo ao encontro de nossos resultados.

Foi observada em *Helix* uma indução do gene c-fos na presença do agente convulsivante corasol e do inibidor de síntese proteica cicloeximida, como em vertebrados superiores. Isso indica que a indução do gene c-fos em *Helix* pode ser estimulada por agentes que também a provocam em vertebrados superiores, sugerindo um mecanismo de regulação intimamente relacionado entre estes grupos animais (GRINKEVICH *et al.*, 1997). Assim, podemos inferir que a proteína c-Fos detectada no SNC de *M. abbreviatus* é semelhante àquela presente em mamíferos, uma vez que a injeção de morfina atuou reduzindo a expressão desta proteína no SNC desta espécie de caracol de forma semelhante ao que ocorre quando o mesmo fármaco é administrado em mamíferos (TÖLLE *et al.*, 1994; BEREITER, 1997; SAADÉ *et al.*, 1997; HARRIS, 1998; TAYLOR *et al.*, 1998).

Está bem determinado que a morfina atua de maneira a reduzir a latência da resposta aversiva nesta espécie de caracol quando administrada antes da exposição ao estímulo térmico (ACHAVAL *et al.*, 2005), o que foi confirmado por este trabalho (ver figura 14).

A análise microscópica das secções histológicas mostrou a existência de neurônios Fos-ir bem definidos nos gânglios do SNC de *M. abbreviatus*, não marcando todas as células de uma mesma região e também mostrando reatividade nos neurônios de maneiras diferentes. Isso indica que apenas algumas células respondem à estimulação nociceptiva de uma determinada área, no caso do complexo CP. Porém, pode-se supor que interconexões intrínsecas dentro do grupo de células marcadas podem ocorrer para recrutar outros neurônios em caso de um

estímulo nocivo mais forte, como ocorre com neurônios serotoninérgicos em *H. lucorum* (ZAKHAROV *et al.*, 1995).

Estudos prévios realizados em *M. abbreviatus* têm revelado a presença de neurônios contendo catecolaminas, serotonina, encefalina, SP e FMRFamida no SNC e SNP deste caracol (ZANCAN, 1996; ZANCAN *et al.*, 1997; FACCIONI-HEUSER, 1999; MORIGUCHI-JEKEL, 2001; FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004; SWAROWSKY *et al.*, 2005). Também foi sugerido o possível envolvimento de alguns destes neurônios no circuito nociceptivo desta espécie animal. Assim, pode-se comparar a localização de tais neurônios, cujo neurotransmissor ou neuropeptídeo sintetizado já é conhecido, com os grupos neuronais que se apresentaram imunorreativos à c-Fos nos gânglios cerebrais deste mesmo caracol na tentativa de correlacioná-los com um provável envolvimento no processo de nocicepção. A distribuição dos neurônios Fos-ir foi ampla ao longo de todo o SNC do caracol, apresentando grupos neuronais marcados semelhantes àqueles encontrados pelos trabalhos citados acima, mostrando a ativação de neurônios que sintetizam e liberam opióides endógenos, serotonina e peptídeos relacionados com os processos de transmissão de informação nociceptiva e de supressão da dor (Fig. 55).

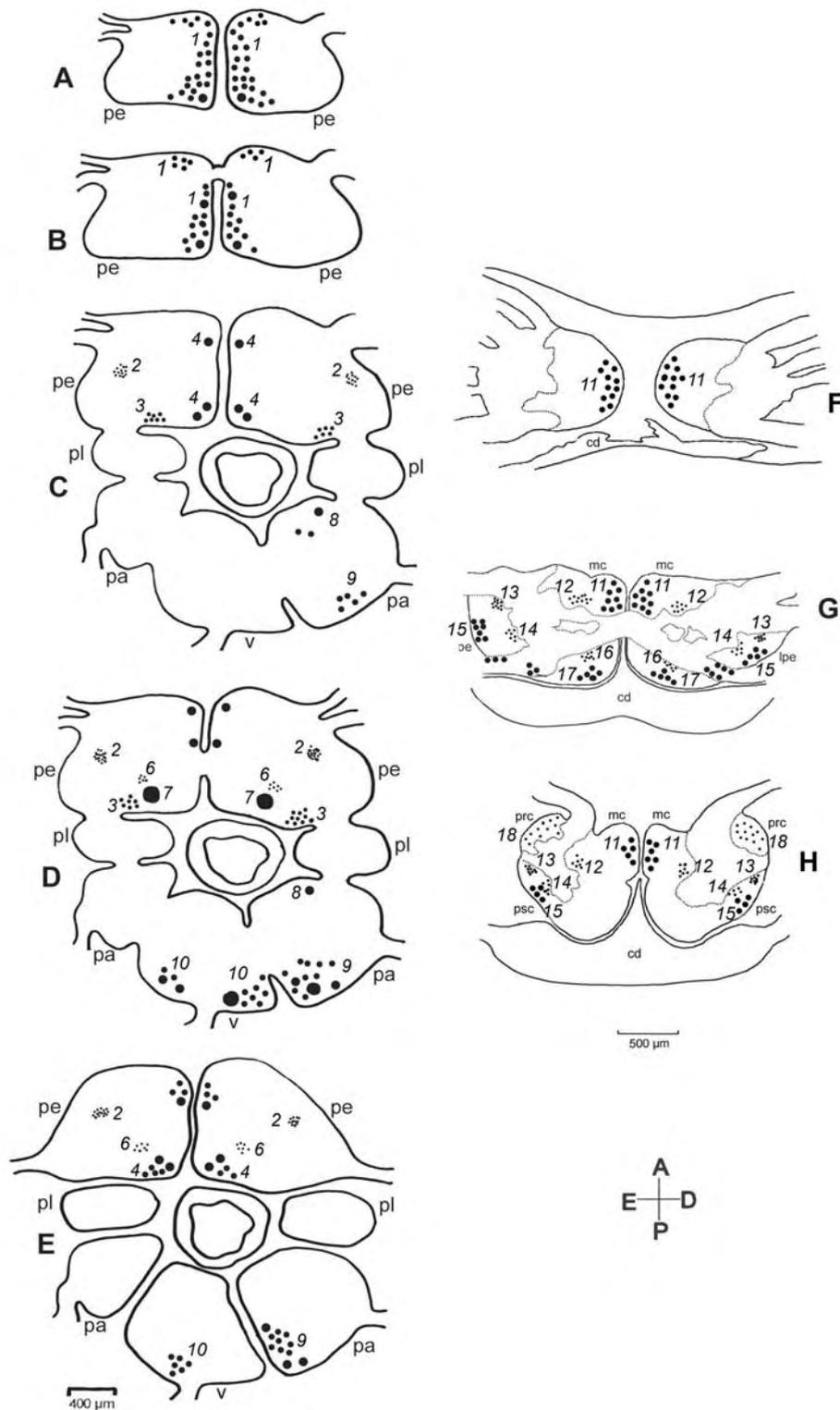
Através da observação dos grupos neuronais Fos-ir descritos neste trabalho e da comparação com a localização de neurônios encefalinérgicos identificados em *M. abbreviatus* (ZANCAN, 1996), pode-se inferir que determinados grupamentos neurais que expressaram a proteína c-Fos sejam responsáveis pela síntese e liberação deste opióide endógeno (Fig. 55, grupos neuronais 5, 7, 10, 15 e 18). Em

moluscos tem sido evidenciada a interação de sistemas opióides endógenos com outros sistemas de neurotransmissão, porém, a base morfológica de

neurotransmissão encefalinérgica, bem como a distribuição destes neurônios ainda é muito pouco conhecida na maioria das espécies de gastrópodos. Em *M. abbreviatus*, a maior quantidade de neurônios MENk-ir foi detectada nos gânglios visceral, parietal direito e pedais (ZANCAN, 1996).

A localização destes neurônios pode correlacionar-se aos neurônios Fos-ir de *M. abbreviatus*. Além disso, esta localização é semelhante aos neurônios serotoninérgicos em *Helix*, dispostos na mesma posição das bordas dos gânglios parietal direito e visceral (Fig. 55, grupos neuronais 9 e 10). Isto sugere que estejam envolvidos no controle do coração e do trato intestinal, deduzido por sua localização e respostas antidrômicas, mas suas funções precisas ainda não são bem conhecidas (ZAKHAROV *et al.*, 1995).

Nos moluscos os mecanismos mediados por opióides endógenos podem deprimir a sensibilidade à dor (DYAKONOVA *et al.*, 1995) e este efeito antinociceptivo pode ser revertido por naloxone (ROMERO *et al.*, 1994), o que também já foi demonstrado em *M. abbreviatus* (ACHAVAL *et al.*, 2005). Desta maneira, podemos inferir que os neurônios Fos-ir localizados em posição semelhante àqueles MENk-ir encontrados nos gânglios centrais do *M. abbreviatus*, podem estar envolvidos em funções modulatórias no amplo repertório comportamental aversivo, pelo qual os animais detectam e reagem aos estímulos nociceptivos.



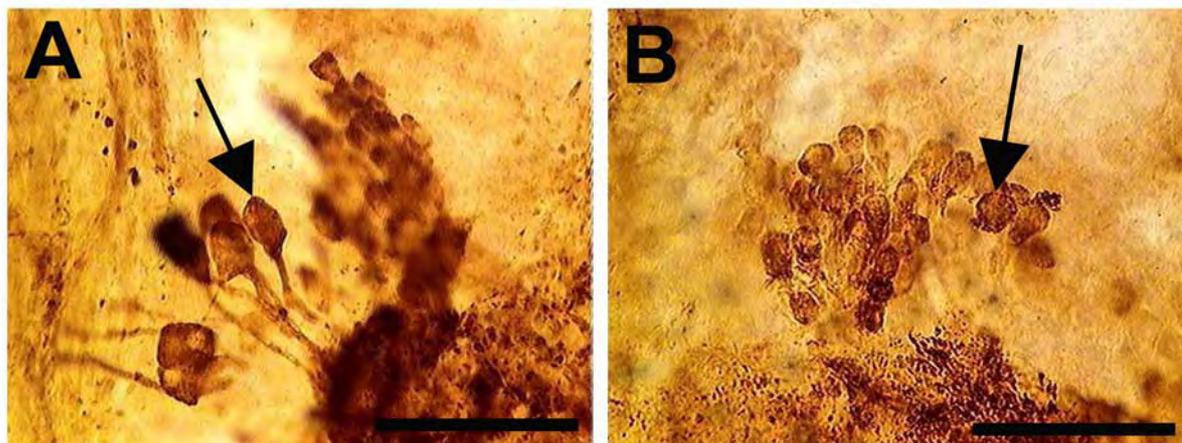
**Figura 55** – Representação esquemática da distribuição dos neurônios Fos-ir nos gânglios do complexo subesofageano (A, B, C, D, E) e nos gânglios cerebrais (F, G, H) de *M. abbreviatus*. A, B, C e F: vista ventral; D e G, vista medial; E e H, vista dorsal. pe, gânglio pedal; pl, gânglio visceral; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; cd, corpo dorsal; mc, mesocérebro; psc, pós-cérebro; prc, pró-cérebro. Os números representam grupos neuronais imunomarcados nas diferentes regiões do SNC do caracol. Orientação: Posterior (P), Anterior (A), Direita (D), Esquerda (E).

Corpos neuronais catecolaminérgicos estão presentes em regiões dos gânglios cerebrais e dos gânglios pedais do SNC de *M. abbreviatus*. No gânglio cerebral desta espécie de caracol os neurônios catecolaminérgicos apresentam uma distribuição similar aos neurônios imunorreativos à dopamina e à tirosina hidroxilase de *Helix pomatia*, o que sugere que estes neurônios observados nos gânglios cerebrais de *M. abbreviatus* sejam dopaminérgicos, uma vez que a dopamina é a catecolamina mais abundante no SNC de diversas espécies de gastrópodos (ZANCAN *et al.*, 1997). Neurônios Fos-ir também foram encontrados em posição similar à dos neurônios catecolaminérgicos nos gânglios cerebrais desta espécie de caracol (Fig. 55, grupos neuronais 16 e 18).

Em animais tratados com morfina e posterior estimulação térmica aversiva, estes neurônios cerebrais continuam a expressar a proteína c-Fos de forma muito semelhante em intensidade e em número de células dos animais controle (Ver figura 46C). Isto indicaria provavelmente que estes neurônios não estejam envolvidos na nocicepção, podendo ser um grupo neuronal envolvido com o fenômeno de novidade e estresse, o qual será discutido mais à frente. Na região do lobo pedal do pós-cérebro dos gânglios cerebrais, a significativa redução da intensidade da reação à proteína c-Fos nos animais tratados com morfina e sacrificados 3 h, 6 h e 12 h após o estímulo aversivo. Estes neurônios também mostraram imunoreatividade à SP e Menk (ZANCAN, 1996), sugerindo isto o provável envolvimento no circuito nociceptivo.

Também nos gânglios pedais deste caracol, os neurônios catecolaminérgicos identificados por ZANCAN e cols. (1997) apresentam localização semelhante com neurônios Fos-ir neste mesmo gânglio (Fig. 55, grupo neuronal 2). Estes neurônios, denominados como laterais no presente trabalho, tampouco mostraram nenhuma

alteração significativa na intensidade da reação imunoistoquímica quando os animais foram tratados com morfina antes do estímulo aversivo (Fig. 56).



**Figura 56 – A:** Detalhe dos neurônios laterais (seta) do gânglio pedal de animais controle, mostrando neurônios Fos-ir. **B:** Neurônios laterais do gânglio pedal de animais que receberam pré-tratamento com morfina 15 min antes de serem submetidos ao estímulo térmico aversivo, mostrando um grupo neuronal (seta) com quantidade semelhante de neurônios Fos-ir e com intensidade de imunorreação que não difere significativamente do grupo controle. Barra: 40  $\mu$ m.

Para confirmar o que foi descrito acima, verificou-se que o padrão de imunorreação foi muito semelhante ao grupo controle e aos grupos salina em todos os diferentes tempos de sacrifício (Ver figura 54 D), o que também nos dá forte indício de que estes neurônios não participem do processo de nocicepção neste caracol.

Neurônios Fos-ir foram encontrados no SNC de *M. abbreviatus* em localizações semelhantes às encontradas nesta mesma espécie (Fig. 55, grupos neuronais 2, 3, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 16 e 18) como sendo imunorreativos à FMRFamida (MORIGUCHI-JECKEL, 2001). No gânglio pedal a expressão na região anterior não mostrou neurônios FMRFamida-ir, no entanto o neurônio Pd4 foi FMRFamida-ir. Algumas destas regiões mostraram ter a marcação de seus neurônios diminuída pelo tratamento com morfina (Ver figuras 53 e 54), o que demonstra o envolvimento destes neurônios no circuito nociceptivo nesta espécie de

gastrópode. Em neurônios sensoriais de moluscos, a FMRFamida tem sido implicada na atividade excitatória de tecidos, e essa atividade parece estar associada à modulação sensorial, particularmente àquela associada à anti-nocicepção (KAVALIERS, 1988a). Em *M. abbreviatus*, neurônios e fibras FLI foram detectados nos gânglios do SNC e no plexo pedioso, onde a FMRFamida teria uma função relevante no processo modulatório e integrativo das funções motoras. A presença de prolongamentos de somas positivos na porção sub-epitelial da musculatura pediosa desses animais sugere uma função neurotransmissora, e as fibras imunomarcadas por toda a extensão da sua musculatura pediosa sugere uma função neurosecretora periférica para o peptídeo FMRFamida. Assim, de um modo geral, os neurônios e as fibras FLI do plexo pedioso deste caracol podem estar envolvidos em circuitos motores, como a locomoção, e em circuitos sensoriais, como a nocicepção (MORIGUCHI-JECKEL, 2001).

Grupos neuronais imunorreativos à c-Fos também foram detectados em localizações muito semelhantes aos neurônios 5-HT em *M. abbreviatus* (ZANCAN *et al.*, 1997; SWAROWSKY *et al.*, 2005) (Fig. 55, grupos neuronais 1, 4, 9, 10, 11 e 15).

No gânglio pedal de *M. abbreviatus*, foram descritos quatro grupos neuronais imunorreativos a 5-HT (SWAROWSKY *et al.*, 2005), porém não todos eles mostraram-se reativos à proteína c-Fos. Onde teve coincidência nas marcações foram nos grupos anterior, medial e posterior.. Entre os neurônios do grupo medial é importante salientar a imunomarcção de um neurônio de tamanho grande, após 12 h e 18h após o estímulo térmico aversivo. Este neurônio foi descrito por Swarowsky e cols. (2005) como sendo possivelmente um neurônio envolvido na modulação do comportamento de retirada neste caracol, identificado como sendo o neurônio Pd4

semelhante ao presente no gânglio pedal de *Helix lucorum* (BALABAN, 2002). Os restantes neurônios c-Fos-ir desta região mostraram uma diminuição da reatividade a esta proteína quando os animais foram injetados com morfina e logo tratados com estímulo aversivo térmico. Estes mesmos neurônios aumentaram sua expressão a 5-HT após estímulo aversivo (SWAROWSKY et al., 2005). Assim podemos concluir que este grupo neuronal medial do gânglio pedal de *M. abbreviatus* está envolvido na nocicepção. Na região posterior após estímulo térmico foi marcado um grupo de neurônios medianos que também são 5-HT (SWAROWSKY et al., 2005). Nesta mesma região também encontrou-se marcado um neurônio gigante que em um trabalho prévio mostrou reatividade a encefalina (ZANCAN, 1996), assim este neurônio provavelmente forme parte da circuitaria nociceptiva.

Na região anterior do gânglio pedal numerosos neurônios 5-HT em estado basal, mostrara um aumento desta imunoreação 6h após o estímulo térmico aversivo (SWAROWSKY et al., 2005). No entanto, a mesma região mostrou poucos neurônios c-Fos-ir após o mesmo tipo de estimulação. Porém, esta imunoreatividade diminui significativamente quando os caracóis foram injetados com morfina previamente à estimulação térmica (6 e 12 h após estímulo nociceptivo). Este neurônio encefalinérgico não foi descrito em outros gastrópodos (MARCHAND et al., 1991; ELEKES et al., 1993; SAKHAROV et al., 1993).

Nos gânglios parietal direito e visceral, a localização de neurônios Fos-ir foi semelhante à dos neurônios 5-HT (Fig. 55, grupos neuronais 9 e 10) em *M. abbreviatus* (ZANCAN et al., 1997), e semelhante também à distribuição neuronal serotoninérgica em *H. lucorum* (ZAKHAROV et al., 1995). Novamente podemos sugerir que estes neurônios ativados em *M. abbreviatus* pelo estímulo térmico aversivo no gânglio visceral estejam envolvidos com controle cardíaco e do trato

intestinal, e que os neurônios do gânglio parietal direito imunomarcados sejam neurônios motores envolvidos no reflexo de retirada, como ocorre em *Helix lucorum* (ZAKHAROV *et al.*, 1995). Para reforçar esta idéia, podemos lembrar que o neurônio denominado Pd4, do gânglio pedal comanda neurônios parietais de retirada. Dentre estes neurônios parietais encontram-se células gigantes, que somente mostraram marcação para c-Fos em animais sacrificados 12 h e 18 h após o estímulo térmico aversivo, sendo a imunoreatividade maior em 18 h. Neste último grupo de 18 h houve justamente um maior número de neurônios imunorreativos nos gânglios parietal direito e visceral. Além disso, entre os neurônios que apareceram marcados neste tempo e nestes mesmos gânglios, uma grande quantidade foi de neurônios grandes e gigantes. Estes neurônios motores de retirada representam o último estágio de integração da informação sensorial no SN de moluscos antes da iniciação do programa motor (BALABAN, 2002). Por outro lado, temos que ter em conta que este neurônio Pd4 c-Fos-ir também foi imunorreativo para FMRFamida (MORIGUCHI-JECKEL, 2001). Assim, este neurônio, como tem postulado Balaban (2002), estaria envolvido na função modulatória, estimulando outros neurônios através da serotonina, e como também produzem o peptídeo FMRFamida que está envolvido na função anti-nociceptiva, provavelmente inibindo o reflexo de retirada, reforçaria a função de papel modulatório deste neurônio Pd4.

As células Fos-ir localizadas na região do mesocérebro dos gânglios cerebrais de *M. abbreviatus* parecem apresentar localização semelhante em *Helix lucorum*, onde é sugerido o envolvimento deste grupo celular na modulação do comportamento alimentar (ZAKHAROV *et al.*, 1995). Podemos sugerir o envolvimento deste grupo celular de neurônios de tamanho médio do mesocérebro (Fig. 55, grupo neuronal 14) em *M. abbreviatus* no circuito nociceptivo, uma vez que

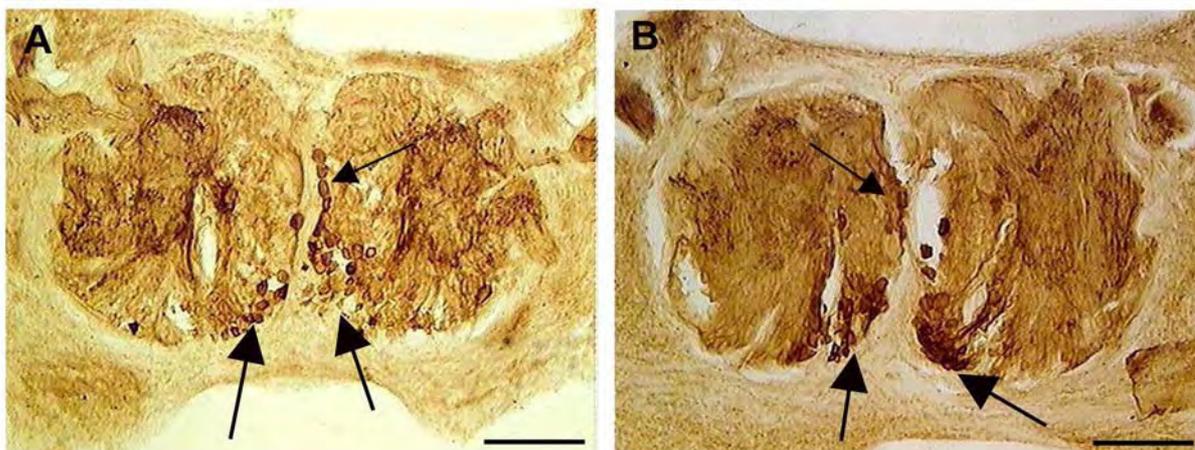
a imunorreação à proteína c-Fos nestes neurônios foi significativamente reduzida pelo tratamento com morfina em animais sacrificados 3 h após o estímulo aversivo (Ver figuras 46B e 53C).

Além disso, estudos no SNP de *M. abbreviatus* também mostraram imunorreatividade à 5-HT no plexo pedioso do músculo do tarso, nos ramos dos nervos pedais, nos gânglios e nas fibras do plexo pedioso, em toda a extensão da musculatura pediosa, bem como na região associada ao integumento ventral. Na região subepitelial ventral encontrou-se uma arborização de fibras varicosas que se originam no plexo pedioso, terminando na região basal do epitélio, e às vezes alguns prolongamentos imunorreativos se estendendo por entre estas células, alcançando a porção apical epitelial (FACCIONI-HEUSER *et al.*, 2004). Estes dados, associados à presença dos neurônios 5HT-ir nos gânglios pedais do caracol, imunomarcados após o animal ser submetido a um estímulo térmico aversivo (SWAROWSKY *et al.*, 2005), sugerem o envolvimento da 5-HT no circuito nociceptivo, e muitos destes neurônios mostraram-se Fos-ir no trabalho aqui descrito.

Outros grupos neuronais imunorreativos á c-Fos no SNC de *M. abbreviatus* (Fig. 55, grupos neuronais 2, 8 12, 13, 14,16, 17e 18) apresentaram localização semelhante a neurônios imunorreativos à substância P (ZANCAN, 1996). Este neuropeptídeo tem sido amplamente detectado em invertebrados, onde seus diferentes tipos de receptores participam na modulação da transmissão nociceptiva e anti-nociceptiva, assim como em vertebrados (HELKE *et al.*, 1990). No SN de moluscos gastrópodos, tem sido demonstrada imunoistoquimicamente a presença de SP relacionada à de mamíferos, como os neurônios SP-ir de *M. abbreviatus*. No plexo pedioso deste caracol também foram encontrados neurônios SP-ir, bem como na região associada ao epitélio (RIGON, *et al.*, 1998). A SP tem sido descrita como

“um neurotransmissor de dor” (SOYGÜDER, 2005). Podemos então sugerir que estes neurônios Fos-ir, que provavelmente sejam os mesmos que expressem SP nessa espécie de caracol estudada, também estejam envolvidos no circuito de nocicepção, uma vez que alguns destes grupos neuronais foram detectados apenas em animais estimulados (Fig. 55, grupo neuronal 16), e outros que apareceram em animais controle, aumentaram em número após o estímulo aversivo.

Nossa observação da expressão e distribuição da proteína c-Fos no SNC de *M. abbreviatus* revelou a existência de grupos neuronais definidos, em todos os grupos experimentais analisados, inclusive nos animais do grupo controle. Estes animais não foram submetidos ao estímulo térmico aversivo, porém foram manipulados antes de serem anestesiados e terem seu SNC retirado. O fato da presença de neurônios Fos-ir nos gânglios do SNC dos animais controle ser menor que a quantidade de células presentes nos mesmos grupos em animais submetidos ao estímulo nocivo e sacrificados em diferentes tempos (Fig. 57), nos sugere o envolvimento destes neurônios em estímulos que poderiam constituir uma novidade para o animal (lavagem da concha e do complexo CP, hidratação, anestesia), desencadeando uma reação de alarme ou estresse, levando a uma ativação neuronal e, em alguns grupos celulares, a um incremento da síntese de proteína c-Fos. Entende-se por “novidade” a resposta observada quando os animais são colocados pela primeira vez frente a uma nova tarefa, não estando relacionada a nenhuma forma de aprendizado específico, à presença de dor durante o treinamento ou à associação com qualquer forma de estresse (IZQUIERDO & NETTO, 1995; ACHAVAL, 1991).



**Figura 57** – Secções horizontais dos gânglios pedais em plano ventral. **A:** Gânglio pedal de animal do grupo controle, mostrando neurônios Fos-ir mediais (seta fina) e posteriores (seta larga). **B:** Gânglio pedal de animal submetido ao estímulo térmico aversivo com tempo de sobrevivência de 6 h após o estímulo. Notar neurônios Fos-ir mediais (seta fina) e grupamentos celulares de neurônios posteriores (seta larga) com quantidade maior de células imunorreativas em relação ao grupo controle. Barra: 400  $\mu\text{m}$ .

Em mamíferos, outros estímulos, que não o de dor, como a injeção intraventricular de colchicina, a injeção de capsaicina ou a imobilização, provocam expressão da proteína c-Fos em determinadas áreas do SNC (CECATELLI *et al.*, 1989). Isto vem ao encontro dos nossos resultados com os animais controle, uma vez que estes não foram submetidos ao estímulo nociceptivo, e também pode explicar a ocorrência de uma imunorreatividade maior da proteína c-Fos nos grupos de animais tratados com salina, a ponto de ser significativamente diferente dos animais controle em determinadas regiões do SNC de *M. abbreviatus*. O problema surge porque é usualmente muito difícil determinar quais eventos exatos foram diretamente responsáveis por provocar a expressão do gene. Este talvez seja o obstáculo mais importante de todos. Por exemplo, a expressão de c-Fos ser uma consequência de estimulação nociva pode estar relacionada ao processo nociceptivo, como é comumente assumido, mas pode igualmente estar relacionada a

parte da resposta de estresse causada pela dor ou pela atividade motora provocada pelo estímulo (HARRIS, 1998).

## 6 – CONCLUSÕES

1. A partir da localização e do tamanho dos neurônios Fos-ir encontrados neste trabalho após o estímulo térmico aversivo e a correlação com dados obtidos de estudos em *M. abbreviatus*, detectando a presença de mediadores químicos envolvidos na nocicepção, podemos sugerir que a imunorreatividade para a proteína c-Fos apresentada neste modelo animal parece estar relacionada à nocicepção, muito mais que à novidade.
2. Podemos afirmar que o neurônio Fos-ir da região medial corresponde ao neurônio Pd4 que estaria envolvido na regulação da nocicepção, dado que este neurônio é também imunorreativo à serotonina e à FMRFamida. Os demais neurônios Fos-ir desta mesma região, por serem serotoninérgicos, também estão envolvidos no circuito nociceptivo, assim como o neurônio gigante da região posterior.
3. Apesar da discrepância quanto à localização da imunorreatividade em relação aos mamíferos, não sabemos como se produz o catabolismo desta proteína, e portanto, não podemos explicar a localização citoplasmática duradoura da proteína c-Fos no *M. abbreviatus*. Nos mamíferos o processo de degradação ocorreria nos proteassomas com ou sem ubiquitinilização. Apesar dessa localização, esta proteína modificou-se após estimulação nociceptiva, assim como injeção de morfina e seguida de estimulação aversiva. Portanto, podemos confirmar a utilidade da proteína c-Fos como um marcador de neurônios envolvidos na circuitaria nociceptiva.

## 7 – PERSPECTIVAS

1. Seria interessante a realização de experimentos com co-localização de mediadores químicos envolvidos na nocicepção em *M. abbreviatus* com a proteína c-Fos, como realizado em *Cepaea nemoralis* para c-Jun e FMRFamida, MENk e 5-HT (DYAKONOVA *et al.*, 1999), para certificar-nos do envolvimento dos grupos neuronais aqui descritos com o processo da nocicepção.
2. Outros estudos podem ser realizados para definir que tipos de receptores estão envolvidos de maneira mais eficaz na indução da proteína c-Fos nestes animais, uma vez que a ativação de diferentes receptores podem levar à indução de c-Fos no encéfalo e na medula espinhal de mamíferos, e que entre eles os receptores AMPA e NMDA são de extrema importância, suportando a hipótese de que receptores para aminoácidos excitatórios ionotrópicos exercem um papel fundamental na ativação de c-Fos.
3. O próximo passo a ser realizado como complemento dos dados obtidos é o término da contagem dos neurônios imunorreativos à c-Fos nos gânglios do SNC de *M. abbreviatus* e a análise estatística da mesma, uma vez que determinados estudos em mamíferos comprovaram diferença estatisticamente significativa no número de neurônios Fos-ir, mas não na DO quando analisados os mesmo grupos.

4. Também é importante a análise do material processado para imunistoquímica para microscopia eletrônica com a finalidade de comprovar ultraestruturalmente a ocorrência da marcação citoplasmática da proteína c-Fos.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, F.V., Melzack, R., 1982. Brainstem lesions dissociate neural mechanisms of morphine analgesia in different kinds of pain. *Brain Res.*, 251, 149-155.
- Achaval, M., 1991. Expressão da proteína c-Fos no sistema nervoso central do rato após a estimulação nociceptiva periférica. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Fisiologia UFRGS. Tese Doutorado. Porto Alegre.
- Achaval, M, Penha, M.A, Swarowsky, A, Rigon, P, Xavier, L.L, Viola, G.G & Zancan, D.M., 2005. The terrestrial gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model in nociceptive experiments: the effects of morphine and naloxone in avoidance behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38: 73-80.
- Balaban, P.M., Bravarenko, N.I., Maksimova, E.N., Ierusalimsky, V.N., Zakharov, I.S., 2001. A Single Serotonergic Modulatory Cell Can Mediate Reinforcement in the Withdrawal Network of Terrestrial Snail. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 75:30-50.
- Balaban, P.M., 2002. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosc. Biobehav. Rev.*, 26, 597-630.
- Bardin, L., Schmidt, J., Alloui, A., Eschalier, A., 2000. Effects of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats. *Europ. J. Pharmacol.*, 409: 37-43.
- Basbaum, A.I., Jessel, T.M., 2000. The perception of pain. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessel, T.M., 2000. *Principles of Neural Science*, 4ed, McGraw-Hill, 980-1000.
- Bereiter, D.A, 1997. Morphine and somatostatin analogue reduce c-fos expression in trigeminal subnucleus caudalis produced by corneal stimulation in the rat. *Neuroscience*, 77(3): 863-874.
- Browstein, M.J. 1994. Neuropeptides. In: Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Moloff, P.B. (eds.) *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. 5<sup>o</sup> ed. New York, Raven Press, 341-365.
- Bullitt, E., 1990. Expression of c-Fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 296: 517-530.
- Bolloch, A.G.M. & Ridgway, R.L. 1995. Comparative aspects of gastropod neurobiology. In: Bredig, O. & Kutsch, W. (eds.). *The Nervous Systems of Invertebrates: An Evolutionary Approach*. Basel, Birkhäuser Verlag, pp.89-113.
- Bot, G., Chahl, L.A., 1996. Induction of Fos-like immunoreactivity by opioids in guinea pig brain. *Brain Research*, 731: 45-56.

- Bullock, T.H. & Horridge, G.A. 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*. Vol 2. San Francisco, Freeman and Co.
- Ceccatelli, S., Villar, M.J., Goldstein, M., Hökfelt, T., 1989. Expression of C-Fos immunoreactivity in transmitter-characterized neurons after stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:; 9569-9573.
- Chase, R., 2002. Behavior and its neural control in gastropod molluscs. Oxford University Press, USA, 314p.
- Cobellis, G., Vallarino, M., Meccariello, R., Pieratoni, R., Masini, M.A., Mathieu, M., Pernas-Alonso, R., Chieffi, P., Fasano, S., 1999. Fos localization in cytosolic and nuclear compartments in neurones of the frog, *Rana esculenta*, brain: an analysis carried out in parallel with GnRH molecular forms. *J. Neuroendocrinol.*, 11:725-735.
- Dragunow, M., Robertson, H. A., 1987. Kindling stimulation induced c-Fos protein in granule cells of the rat dentate gyrus. *Nature*, 329: 441-422.
- Dragunow, M., Peterson, M.R., Robertson, H.A., 1987. Presence of C-Fos-Like immunoreactivity in the adult rat brain. *European Journal of Pharmacology*, 135: 113-114.
- Dragunow, M., Robertson, H.A., 1988. Localization and induction of C-Fos protein-like immunoreactive material in the nuclei of adult mammalian neurons. *Brain Research*, 440: 252-260.
- Dyakonova, V.E., Elofsson, R., Calberg, M., Sakharov, D.A., 1995. Complex avoidance behavior and its neurochemical regulation in the land snail *Cepaea nemoralis*. *Gen. Pharmacol.*, 26: 773-777.
- Dyakonova, V., Elofsson, R., Carlberg, M., Sakharov, D.A., 1999. Effects of naloxone on C-Jun/ AP-1 in met-enkephalin and FMRFamide-immunoreactive neurons of a gastropod snail. *Acta Biologica Hungarica* 50 (1-3): 43-54.
- Elekes, K., Stefano, G.B., Carpenter, D.O., 1993. Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods ( *Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica*): a comparative immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.*, 272: 329-341.
- Elliott, C.J.H. & Kemenes, G., 1992. Cholinergic interneurons in the feeding system of the pond snail *Lymnaea stagnalis*. II. N1 interneurons make cholinergic synapses with feeding motoneurons. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 336: 167-180.
- Faccioni-Heuser, M. C., 1999. Aspectos histofisiológicos da musculatura e do plexo pedioso do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus*. *Ciências Biológicas: Fisiologia UFRGS*. 284f. Porto Alegre.
- Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M., 2004. Monoamine in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus*. *J. Med. Biol. Res.*, in press.

- Ferraz, A. C., Xavier, L. L., Hernández, S., Sulsbach, M., Viola, G. G., Anselmo-Franci, J. A., Achaval, M., Da Cunha, C., 2003. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6-hydroxydopamine. *Brais Res.*, 986: 200-205.
- Fiorito, G., 1986. Is there "pain" in invertebrates? *Behavioural Processes*, 12: 383-388.
- Fickbohn, D.J., Lynn-Bullock, C.P., Spitzer, N., Caldwell, H.K., Katz, P.S., 2001. Localization and quantification of 5-hydroxytryptophan and serotonin in central nervous system of *Tritonia* and *Aplysia*. *J. Comp. Neurol.*, 437, 91-105.
- Florey, E. 1963. Acetylcholine in invertebrate nervous system. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41: 2619-2626
- Fonta, C., Gascuel, J., Masson, C., 1995. Brain FOS-like expression in developing and adult honeybees. *Neuroreport*, 6:745-749.
- Gass, P., Eckhardt, A., Schröder, H., Bravo, R., Herdegen, T., 1996. Transient expression of the mitogen-activated protein kinase phosphatase MKP-1 (3CH134/ERP1) in the rat brain after limbic epilepsy. *Mol. Brain Res.*, 41:74-80.
- Gerschenfeld, H.M. 1973. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.*, 53:1-119.
- González-Lima, F., Garrosa, M., 1991 A quantitative histochemistry of cytochrome oxidase in rat brain. *Neurosc. Lett.*, 123: 251-252.
- Greenberg, M.E., Ziff, E.B., Greene, L.A., 1986. Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induced rapid gene transcription. *Science*, 234:80-87.
- Grinkevich, L.N., Nagibneva, I.N., Lisachev, P.D., 1997. Conditioned Defensive reflex in the edible snail (Molecular-Genetic aspects). *Neurosci. Behav. Physiol.*, 27(3): 216-220.
- Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S., Kandel, E. R., 1986. The long and the short long-term memory – a molecular framework. *Nature*, 322: 419-422.
- Harris, J.A., 1998. Using *c-fos* as a Neural marker of Pain. *Brain Res. Bull.*, 45: 1-8.
- Helke, C.J., Krause, J.E., Mantyh, P.W., Couture, R. & Bannon, M.J., 1990. Diversity in mammalian tachykinin peptidergic neurons: multiple peptides, receptors and regulatory mechanisms. *FASEB J.*, 4: 1606-1615.
- Hevner, R. F., Liu, S., Wong-Riley, M. T. T., 1995. A metabolic map of cytochrome oxidase in the rat brain: histochemical densitometric and biochemical studies. *Neurosc.*, 65: 313-342.

- Hirst, M., Kavaliers, M., 1987. Levorphanol but not dextrorphan suppresses the foot-lifting response to an aversive thermal stimulus in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology*, 26: 121-123.
- Hunt, S.P., Pini, A., Evan, G., 1987. Induction of C-Fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 228: 632-634.
- Hunt, S.P., 1983. Cytochemistry of the Spinal cord. In: EMSON, P. C. (ed.). *Chemical neuroanatomy*. New York, Raven Press, P. 53-84.
- Hyman, L.H., 1967. *The Invertebrates: Mollusca I*. New York, McGraw-Hill. 792pp.
- Izquierdo, I., Netto, C.A., 1985. The role beta-endorphin in behavioral regulation. *Ann. New York Acad. Sci.*, 444:162-177.
- Jennings, E., Fitzgerald, M., 1996. C-fos can be induced in the neonatal rat spinal cord by both noxious and innocuous peripheral stimulation. *Pain*, 68:301-306.
- Jessel, T.M.; Kandel, E.R.; Schwartz, J.H., 1995. *Essentials of neural science and behavior*. London, Prentice Hall. 743pp
- Kandel, E.R., 1979. *Behavioral Biology of Aplysia*. USA, W.H Freeman Co. 463pp.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H. & Jessel, T.M. 1995. *Essentials of Neural Science and Behavior*. London, Prentice Hall. 743pp.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., 2000. *Principles of Neural Science*. New York, McGraw-Hill Co.
- Kavaliers, M., Choleris, E., Saucier, D.M., 1997. The NMDA receptor antagonist, NPC 12626, reduces the pronociceptive effects of orphanin FQ and kappa opiate antinociception in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Elsevier Science Inc.*, 18: 943-947.
- Kavaliers, M., Hirst, M., Teskey, G C., 1983. A functional role for an opiate system in snail thermal behavior. *Science*, 220: 99-101.
- Kavaliers, M., Hirst, M., 1984. The presence of an opioid system mediating behavioral thermoregulation in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology*, 23(11): 1285-1289.
- Kavaliers, M., 1987. Evidence for opioid and non-opioid forms of stress-induced analgesia in the snail, *Cepaea nemoralis*. *Brain Res.*, 410,111-115.
- Kavaliers, M., 1988a. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.*, 21, 923-932.
- Kavaliers, M., 1988b. Novelty-induced opioid analgesia in the terrestrial snail *Cepaea nemoralis*. *Physiol. Behav.*, 42, 29-32.

- Kavaliers, M., 1989. Evolutionary aspects of the neuromodulation of nociceptive behaviors. *Amer. Zool*, 29: 1345-1353.
- Kavaliers, M. & Hirst, M., 1986. Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in slug *Limax maximus*. *Life Sci.*, 38: 203-209.
- Kavaliers, M., Perrot-Sinal., 1996. Pro nociceptive effects of the neuropeptide, nociceptin, in the land snail, *Cepaea nemoralis*. *Peptides.*, 17, 763-768.
- Kovács, K.J., 1998. C-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int.* 33: 287-297.
- Larsson, L., 1983. Methods for Immunocytochemistry of Neurohormonal Peptides. In: BJÖRKLUND, A. & HÖKFELT, T. (eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy. Methods in Chemical Neuroanatomy*. Amsterdam, Elsevier, V.1. pp. 147-209.
- Lima,D., 1998. Anatomical basis for the dynamic processing of nociceptive input. *Eur.J.Pain*,2:195-202.
- Levine, J.D., Murphy, D.T., Seidenwurm, D., Cortez, A., Fields, H.L., 1980. A study of quantal (all-or-none) change in reflex latency produced by opiate analgesics. *Brain Res.*, 201, 129- 141.
- Marchand, C.D., Griffond, B., Mounzih, K., Colard, C., 1991. Distribution of methionine-enkephalin-like and FMRFamide-like immunoreactivities in the central nervous system (including dorsal bodies) of snail *Helix aspersa* Müller. *Zool. Sci.*, 8: 905-913.
- Menétrey, D., Gannon, A., Levine, K.D., Basbaum, A. I., 1989. Expression of c-Fos protein in the interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular and visceral stimulation. *J. Comp. Neurol.*, 285: 177-195.
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hemstead, J. L., Curran, T., 1987. Mapping patterns of c-Fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237: 192-197.
- Morgan, J.I., Curran, T., 1989. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS*, 12:459-462
- Morgan, J.I., Curran, T., 1991. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14:421-51.
- Moriguchi-Jeckel, C.M.M., 2001. A imunorreatividade a FRMFamida no sistema nervoso central e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Neurociências, UFRGS, RS, Brasil, 90p.

- Naranjo, J.R., Mellstrom, B., Achaval, M., Sassone-Corsi, P., 1991a. Molecular pathways of pain: Fos/Jun-mediated activation of the podynorphin gene through a non-canonical AP-1 site. *Neuron*. 6:223-227.
- Naranjo, J. R., Mellstrom, B., Achaval, M., Lucas, J. J., Del Rio, J., Sassone-Corsi, P., 1991b. Co-induction of Jun B and c-Fos in a subset of neurons in the spinal cord. *Oncogene*, 6: 223-227.
- Nestler, E.J., Hyman, S.E., Malenka, R.S. 2001. *Molecular Neuropharmacology*. A Foundation for Clinical Neuroscience. McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 539p.
- Ottaviani, E., Malagoli, D., Kletsas, D., 1999. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  induce shape changes in invertebrate immunocytes via multiple signalling pathways and provoke the expression of Fos-, Jun- and SMAD-family members. *Comp. Biochem. Physiol.*, 122: 389-395.
- Partata, W. A, Krepsy, A. M., Xavier, L. L., Marques, M., Achaval, M., 1999. Distribution of glycogen phosphorylase and cytochrome oxidase in the central nervous system of the turtle *Trachemys dorbigni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 124<sup>A</sup>: 113-122.
- Penha, M.A., 2001. Um modelo de comportamento aversivo térmico em *Megalobulimus oblongus* e a ação de fármacos nos sistemas opióide e serotoninérgico envolvidos na nocicepção. Master thesis, Programa de Pós-graduação em Neurociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil, 102p.
- Perkins, K.K., Dailey, G.M., Tjian, R., 1988. Novel Jun and Fos-related proteins in *Drosophila* are functionally homologous to enhancer factor AP-1. *The EMBO Journal*, 7(13): 4265-4273.
- Prado, P.T.C., Del Bel, E.A., 1998. C-fos, um gene de ativação imediata como marcador neural de nocicepção. *Medicina*, Ribeirão Preto, 31: 424-433.
- Prosser, C.L. 1991. *Comparative animal Physiology. Neural and Integrative Animal Physiology*. New York, Wiley- Liss. 776pp.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1997. *Farmacologia*. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Rasia-Filho, A. A., Xavier, L. L., Santos, P., Gehlen, G., Achaval, M., 2002. Glial fibrillary acidic protein immunodetection and immunoreactivity in the anterior and posterior medial amygdala of male and female rats. *Brain Res. Bull.*, 58: 67-75.
- Riese, J., Tremmi, G., Bienz, M., 1997. D-Fos, a target gene of Decapentaplegic signalling with a critical role during *Drosophila* endoderm induction. *Development* 124: 3353-3361.

- Rigon, P., Oliveira, A.H., Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M., 1998. Imunorreatividade à substância P no plexo pedioso do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus*. VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular. Montevideo, Uruguai.
- Rodrigo, J.; Peinado, M. A.; Sánchez, E.; Pedrosa, J.A .; Bentura, M.L.; Esteban, F.J.; Torres, M.I.; Martínez-Murillo, R. 1996. Técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la microscopía eletrónica. In: Peinado, M.A.; Pedrosa, J.A.; Rodrigo, J. (eds) *Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Torredonjimeno (Jaén), Publicaciones de la Universidad de Jaén. pp. 178 - 201.
- Romero, S.M.B., Hoffmann, A., Menescal de Oliveira, L., 1994. Is there an opiate receptor in the snail *Megalobulimus sanctipauli*? Action of morphine and naloxone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107C: 37-40.
- Saadé, N.E., Joude, P.G.A., Saadeh, F.A., Hamoui, S., Safieh-Garabedian, B., Kanaan, S. A., Atweh, S. F., Jabbur, S. J., 1997. Fos-like immunoreactivity by intraplantar injection of endotoxin and its reduction by morphine. *Brain Res.*, 769: 57-65.
- Sakharov, D., Nezlin, L., Moroz, L., Elofsson, R., 1993. Pattern of enkephalin immunolabeling in the pulmonate snail *Cepaea nemoralis* and related molluscs. *Brain Res.*, 620: 114-121.
- Sanberg, P. R., Ossenkopp, K., Kavaliers, M., 1988. The behavioral Biology of Nociception: An Introduction to the symposium. *Brain Res. Bull.*, 21: 921-922.
- Santos, P.C, Gehlen, G., Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M. 2002. Distribution of glial cells in the central nervous system of the pulmonate snail *Megalobulimus oblongus* identified by means of a glial fibrillary acidic protein marker. *Acta Zool.*, 83: 345-351.
- Scharrer, B., 1987. Neurosecretion: beginnings and new directions in neuropeptide reseach. *Ann. Ver. Neurosci.*,10: 1-17.
- Smith, J. A., 2005. A Question of Pain in Invertebrates. *ILAR Journal Online*, 33: 1-2 ([http://dels.nas.edu?ilar\\_n/ilarjournal/33\\_1\\_2/V33\\_1\\_2Question.shtml](http://dels.nas.edu?ilar_n/ilarjournal/33_1_2/V33_1_2Question.shtml) em 22/05/2005)
- Sneddon, L.U., 2004. Evolution of nociception in vertebrates: comparative analysis of lower vertebrates. *Brain Res.*, 46: 123-130.
- Sonnenberg, J. L., Rauscher, J. F., Morgan, J. I., Curran, T., 1989. Regulation of proenkephalin by Fos and Jun. *Science*, 246: 1622-1625.
- Soygüder, Z., 2005. Multiple neurotransmitter receptors contribute to the spinal Fos expression. *Brain Research* 1033: 202-209.

- Stefano, G.B. 1988. The involvement of signal systems: conformational matching a determining force stabilizing families of signal molecules. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90C: 287-294.
- Sternberger, L. A ., 1979. *Immunohistochemistry*. Chichester, Wiley and Sons. 338p.
- Swarowsky, A., Monteiro, A. F., Xavier, L. L., Zancan, D. M., Achaval, M. 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141A, 230-238.
- Taylor, P., Brown, J.H., 1999. Acetylcholine. In: Agranoff, B.W., Abers, R.W., Fischer, S.K., Ulfert, M.D. (eds). *Basic neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers, p. 213-243.
- Taylor, J., Mellström, B., Fernaud, I., Naranjo, J.R., 1998. Metamizol potentiates morphine effects on visceral pain and evoked c-Fos immunoreactivity in spinal cord. *Eur. J. Pharmacol.*, 351:39-47.
- Thomé, J.W., Carara, A.E.Q., Mallmann, M.T. Lopes, P.T.C., Schneider, V.L. 1994. Manual de aulas práticas de zoologia: estudo morfo-anatômico de um gastrópode mesuretra. Cadernos EDI-PUCRS, Série Zoologia, Porto Alegre, 30pp.
- Tierney, A.J., 2001. Structure and function of invertebrates 5-HT receptors: a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, 128A, 791-804.
- Tölle, T.R., Schadrack, J., Castro-Lopes, J. M., Evan, G., Roques, B.P., Zieglgänsberger, W., 1994. Effects of Ketorphan and morphine before and after noxious stimulation on immediate-early gene expression in rat spinal cord neurons. *Pain*, 56: 103-112.
- Walcourt-Ambakederemo, A., Winlow, W., 1994. 5-HT receptors on identified *Lymnaea* neurons in culture: pharmacological characterization of 5-HT<sub>2</sub> receptors. *Gen. Pharmacol.*, 25, 1079-1092.
- Walker, R.J., Holden-Dye, L., 1989. Commentary on the evolution of transmitters, receptors and ion channels in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93A: 25-39.
- Walters, E.T., 1987. Multiply sensory neurons correlates of site-specific sensitization. *J. Neurosci.*, 7: 408-417.
- Zakharov, I.S., Ierusalimsky, V.N., Balaban, P.M., 1995. Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix*. *Invert. Neurosci.*, 1:41-52.

- Zancan, D.M., 1996. Localização de mediadores químicos nos glânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação do corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus abbreviatus*. Tese de Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 238p.
- Zancan, D.M., Brauer, M., Achaval, M., 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A, 765-772.
- Zancan, D.M., Nóbrega, H.G., Severino, A.G., Achaval, M., 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. exp.*, 75: 75-86.