



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

ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL

TERRESTRE *Megalobulimus abbreviatus* E SEU PROVÁVEL

ENVOLVIMENTO NA NOCICEPÇÃO

Paula Rigon da Luz Soster

Porto Alegre

2009



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

ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO CARACOL
TERRESTRE *Megalobulimus abbreviatus* E SEU PROVÁVEL
ENVOLVIMENTO NA NOCICEPÇÃO

Paula Rigon da Luz Soster

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Matilde Achaval Elena

Porto Alegre
2009

“A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar”.

Eduardo Galeano

AGRADECIMENTOS

À Professora Matilde Achaval Elena, amiga e “MAE”, por todo o ensinamento que me transmitiu ao longo do período de graduação, mestrado e doutorado. Pela competência com que me orientou e pelo forte elo de amizade que estabelecemos. Pela incrível disponibilidade em ajudar em todas as etapas deste trabalho, meu profundo agradecimento. Tenho em sua pessoa um modelo ético e profissional a seguir em minha vida.

À Professora Maria Cristina Faccioni-Heuser, minha amiga Cris, por ter sempre uma palavra amiga, pelo bom humor e principalmente pela grande torcida para o término deste trabalho. Teu apoio foi fundamental ao longo destes anos!

À Professora Denise Maria Zancan, pela grande disponibilidade em ajudar sempre que foi preciso, pela “divisão” dos caracóis ao longo destes anos e pelas sugestões durante a redação dos artigos científicos.

À amiga Juliana, por compartilhar comigo as angústias desta nossa reta final, por estar sempre próxima quando mais precisei. Colega, companheira, grande incentivadora, sempre destacando minhas qualidades e me ajudando a buscar cada vez mais! Te devo muito! Obrigada por estar comigo! Espero que nossa amizade não se resuma apenas a estes quatro anos de doutorado “compartilhado”.

Ao Léder, meu amigo e “irmão”, sempre disposto, disponível, preocupado e grande incentivador em todos estes anos de trabalho.

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. Por me ensinar o verdadeiro significado da palavra amor, por ter se tornado essa pessoa fundamental em minha vida e neste momento por esperar, junto comigo, pacientemente o término desta conquista e a chegada de “nosso grande feito deste período”: nossa tão amada e querida filha Isabella.

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

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Morfológicas desta universidade, pela oportunidade que me deram de serem meus colegas durante alguns anos desta caminhada. Agradeço aqui especialmente aos queridos professores e amigos Geraldo Jotz, Rui Felix e Adriana Mikich: vocês foram fundamentais ao longo destes anos!

ÍNDICE

Lista de abreviaturas.....	VIII
Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XV
Resumo.....	XVI
Abstract.....	XVII
1 – Introdução.....	1
1.1 - Nociceção em invertebrados.....	2
1.2 – Circuitos neurais e nociceção em invertebrados.....	5
1.3 – Modulação da resposta nociceptiva em invertebrados.....	7
1.4 – Sistema nervoso central do <i>Megalobulimus abbreviatus</i>	10
1.5 – Mediadores químicos no SNC do <i>Megalobulimus abbreviatus</i>	13
1.6 – Óxido nítrico.....	17
1.6 – Óxido nítrico e nociceção.....	24
2 – Objetivos.....	28
2.1 – Objetivo geral.....	29
2.2 – Objetivos específicos.....	29
3 – Material e métodos.....	31
3.1 – Artigo I.....	34
3.1.1 – Procedimento histoquímico para detecção de atividade NADPH-diaforase.....	34
3.2 – Artigo II.....	36
3.2.1 – Estímulo térmico aversivo.....	36
3.2.2 – Procedimento histoquímico para detecção de atividade NADPH-diaforase.....	37
3.2.3 – Aquisição de dados.....	37
3.2.4 – Análise estatística.....	39
3.3 – Artigo III.....	40
3.3.1 – Preparo das soluções e injeção.....	40
3.3.2 – Estímulo térmico aversivo.....	40
3.3.3 - Estímulo químico aversivo.....	40
3.3.4 – Procedimentos experimentais para determinação dos efeitos de L-	

NAME e SNP.....	41
3.3.5 – Análise estatística.....	43
4 – Resultados.....	44
4.1 – Artigo I.....	45
4.2 – Artigo II.....	86
4.3 – Artigo III.....	98
6– Conclusões.....	122
7 – Perspectivas.....	131
8 – Referências bibliográficas.....	133

LISTA DE ABREVIATURAS

5,7-DHT	5,7-diidroxitriptamina
5-HT	Serotonina
5-HT _{1r}	Imunorreativo à serotonina
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AOI	Área de interesse óptico
ATP	Trifosfato de adenosina
BH ₄	Tetrahydro-L biopterina
Ca ⁺⁺	Cálcio
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
CP	Cabeça-pé
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FMRFamida	Fenilalanina-Metionina-Arginina-Fenilalanina amida
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil Ester
LPS	Lipopolissacarídeo
LTP	Potenciação de longa duração
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH-d	NADPH diaforase
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal

NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSir	Imunorreativo à óxido nítrico sintase
NPA1	Área neuropilar 1
NPA2	Área neuropilar 2
O ₂	Oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	S-nitro-n-acetilpenicilamida
SP	Substância P
TF	Tampão fosfato
TFP	Trifluoperazina
TRPV1	Transien receptor potential channel - vanilloid 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<p>A: Representação esquemática do caracol <i>M. abbreviatus</i> 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 <i>M. abbreviatus</i>. Observar que, após protração, o caracol exhibe uma elevação anterior do complexo cabeça-pé a 1 cm do substrato, caracterizando o comportamento aversivo.....4</p>
Figura 2	<p>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).....11</p>
Figura 3	<p>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, metacérebro: lpe, lobo pedal; lpl, lobo pleural; lc, lobo comissural; cd, corpo dorsal. A este nível de secção não se observa a comissura cerebral.....12</p>
Figura 4	<p>Reação catalizada pela óxido nítrico sintase.....19</p>
Figura 5	<p>Animal adulto utilizado para experimentação. CP, complexo cabeça-pé; asterisco, concha; seta, borda virada de coloração rósea; cabeça de seta, tentáculos posteriores; seta dupla, palpos labiais.....32</p>
Figura 6	<p>Animal joven utilizado para experimentação. CP, complexo cabeça-pé; asterisco, concha.....33</p>
Figura 7	<p>Modelo da placa quente utilizada para aplicação do estímulo térmico aversivo.....36</p>

Artigo I

Figure 1	<p>A, B and C- Schematic representation of cerebral ganglia from adult snail <i>M.</i></p>
----------	---

abbreviatus sectioned at different levels, displaying the NADPH-d positive neurons (black circles) and fibers. cc, cerebral commissure; db, dorsal body; mc, mesocerebrum; pmt, pedal lobe of metacerebrum; plmt, pleural lobe of metacerebrum; prc, procerebrum. **D**-Medial view of the cerebral ganglia showing the cerebral commissure (cc), neuropilar areas (NP) with thin fibers and dense clusters (np) of neuronal and glial processes, medullar mass with little staining (asterisk), mesocerebrum (mc), pleural lobe of metacerebrum (plmt). Scale bar: 250 μ m. **E**-Dorsal section of mesocebrum (mc) showing a cluster of medium neurons (arrows) NADPH-d positives and the dorsal body (db) whit reactivity. Scale bar: 100 μ m. **F**-Small glial-like cell with a multipolar aspect (asterisk) and positive processes (arrow) in procerebrum. Scale bar: 10 μ m.....80

Figure 2 **A, B and C**- Schematic representation of cerebral ganglia from *M. abbreviatus* young snail sectioned at different levels, displaying the NADPH-d neurons (black circles) and fibers. cc, cerebral commissure; db, dorsal body; mc, mesocerebrum; pmt, pedal lobe of metacerebrum; plmt, pleural lobe of metacebrum; prc, procerebrum. **D**- Medial section of pedal lobe of metacerebrum with medium-sized neurons (arrows) and small-sized neurons (arrowhead) positives. Scale bar: 50 μ m. **E**- Dorsal section of the pleural lobe of metacerebrum showing a large neuron (asterisk) and medium neurons (arrow). Scale bar: 50 μ m. **F**- Dorsal section of mesocerebrum showing a giant neuron (double asterisk) and a cluster of medium neurons (double arrow). Scale bar: 100 μ m.....81

Figura 3 **A, B, C, D and E**- Schematic representation of pedal ganglia from adult *M. abbreviatus* sectioned at different levels, displaying the NADPH-d neurons (black circles) and fibers. Black circles: cytoplasmatic activity; grey circles: nuclear activity. **F**- Ventral view of the pedal ganglia showing neuronal clusters with enzymatic activity in the cytoplasm (double arrowhead) and in the nuclei (arrow). Scale bar: 100 μ m. **G**- Higher magnification showing enzymatic cytoplasmatic activity and negative nuclei (black asterisk) and enzymatic nuclear activity (white asterisk). Scale bar: 25 μ m. **H**- Section at level of ventral commissure (vc); note a giant medial neuron NADPH-d positive (arrow). Scale bar: 250 μ m. **I**-Section at level of major commissure (MC) with giant neurons (arrows) and large neuron (arrowhead) in the medial region. Scale bar: 250 μ m. **J**- Giant neuron (double white asterisk) located in the medial region (named Pd4). Scale bar: 100 μ m. **K**- In the posterior region of the pedal ganglia note a large neurons (black asterisk) and a giant neuron (white asterisk). Scale bar: 100 μ m. **L**- In the anterior region of the pedal ganglia note a large neuron (asterisk) with a cluster of medium-sized neurons (arrow) and small-sized neurons (arrowhead). Scale bar: 100 μ m. **M**- In the lateral region of the pedal ganglia note a large neuron (asterisk) with processes (arrow) extending to the neuropile (NP). Scale bar: 50 μ m.....82

Figure 4 **A and B**- Schematic representation of pleural ganglia (pl), right parietal ganglia (rpa), left parietal ganglia (lpa) and visceral ganglion (v) from adult snail sectioned at different levels, displaying neurons with the NADPH-d cytoplasm (black circles), the positive nuclei NADPH-d (grey circles) and fibers. **C**- Section of pleural ganglia with the neuropilar area (NP) displaying strong activity and

small neurons in the cytoplasm (arrow) or in nuclei (arrowhead). Scale bar: 100 μm . **D**- Higher magnification of small-sized neurons of the pleural ganglia showing the positive nuclear area (asterisk). Scale bar: 10 μm . **E and F**- In the right parietal ganglia (E) and in the visceral ganglion (F) note the different positive giant (double asterisk), large (white asterisk) and medium (double arrow) neurons. Scale bar: 100 μm83

- Figure 5 **A, B, C, D and E**- Schematic representation of the subesophageal complex from young *M. abbreviatus* sectioned at different levels displaying NADPH-d neurons (black circles) and fibers. pe, pedal ganglia; pl, pleural ganglia; rpa, right parietal ganglia; lpa, left parietal ganglia; v, visceral ganglion. **F**- Section of pedal ganglia showing the neuropilar areas (NP1 and NP2), and neurons in anterior (a), medial (m) and posterior (p) regions. Scale bar: 250 μm . **G**- Medial area of the pedal ganglia with higher magnification of the giant Pd4 neuron (asterisk) located. Scale bar: 50 μm . **H**- Anterior region of pedal ganglia with large neurons (white asterisk) and a cluster of medium-sized neurons (mn). Scale bar: 50 μm . **I and J**- Posterior region of pedal ganglia showing small neurons (double arrow), medium neurons (arrowhead) and large positive neurons (white asterisk). Scale bar: 100 μm . **K**- In right parietal ganglia note giant (black asterisk), large (white asterisk) and medium-sized positive neurons (arrowhead). Scale bar: 100 μm . **L**- In left parietal ganglia note giant negative neuron (asterisk) with a trophospongium (arrowhead) positive. Scale bar: 100 μm . **M**- In visceral ganglion note giant (black asterisk), large (white asterisk) and medium-sized NADPH-d neurons (arrows). Scale bar: 100 μm84
- Figure 6 **A** – Schematic representation of NADPH-d positive cell bodies and fibers in the buccal ganglia from adult (**B**) and young (**C**) snail. bc, buccal commissure. Scale bar: 500 μm . **B and C**- Sections showing the neuropilar area (NP), large (asterisk) and medium (arrow) neurons located similarly in both snail. Scale bar: 100 μm85

Artigo II

- Figure 1 **a**: Schematic representation of the pedal ganglia showing the positions of the sampling boxes ($15.050 \mu\text{m}^2$) placed over the analyzed regions: 1- anterior neurons (an), 2- medial neurons (mn), 3- posterior neurons (pn), 4- lateral neurons (ln), 5- neuropilar area 1 (NPA1) and 6- neuropilar area 2 (NPA2). **b**: Schematic representation of the pedal ganglia (pe) sectioned at different levels, displaying the NADPH-d positive neuronal distribution (circles) and nerve fibers *M. abbreviatus*. These figures are representative of young and adult animals. **b1** and **b2**: ventral sections; **b3** and **b4**: medial sections; **b5**: dorsal section. Neuropilar 1 (NPA1) and neuropilar 2 (NPA 2) areas. A=Anterior, P=posterior, L=left and R=right. Scale bar: 400 μm90
- Figure 2 Digitized images of the different areas of the pedal ganglia of *M. abbreviatus*

submitted to NADPH-d histochemistry. **(a)** Ventral area of the pedal ganglia of an adult animal showing NADPH-d positive neurons in medial region (mn) and neuropilar areas NPA 1 and NPA 2. Scale bar: 250 μ m. **(b)** Section through the medial region of the pedal ganglia of a young animal. Note the anterior neurons (double asterisk), posterior neurons (asterisk) and neuropilar areas NPA 1 and NPA 2. Scale bar: 250 μ m. **(b1)** Higher magnification of the boxed area in (b). Note the giant neuron located in the medial region (named Pd4). Scale bar: 100 μ m. **(c)** Section through the major pedal commissure (MPC) of the pedal ganglion, showing the posterior NADPH-d positive neuronal cluster (asterisk). Scale bar: 250 μ m.....91

- Figure 3 Optical density (OD) measurements (mean \pm SD) obtained from different experimental groups at different periods of survival, showing the effects of thermal stimulus on the anterior (**a** and **b**) and lateral (**c** and **d**) NADPH-d positive neurons in the pedal ganglia of *M. abbreviatus*. In the graphs a = p<0.05 when compared with control; b = p<0.05 when compared with animals sacrificed 3 hours after stimulus; c = p<0.01 when compared with animals sacrificed 6 hours after stimulus; d = p<0.05 when compared with animals sacrificed 12 hours after stimulus; asterisk indicate difference obtained when compared young and adult animals controls or at same time of survival (*p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001) (two way ANOVA, Tukey test).....92
- Figure 4 Optical density (OD) measurements (mean \pm SD) obtained from different experimental groups at different periods of survival, showing the effects of thermal stimulus on the medial (**a** and **b**) and posterior (**c** and **d**) NADPH-d positive neurons in the pedal ganglia of *M. abbreviatus*. In the graphs a = p<0.05 when compared with control; b = p<0.05 when compared with animals sacrificed 3 hours after stimulus; c = p<0.01 when compared with animals sacrificed 6 hours after stimulus; d = p<0.05 when compared with animals sacrificed 12 hours after stimulus; asterisk indicate difference obtained when compared young and adult animals controls or at same time of survival (***) p<0.001) (two way ANOVA, Tukey test).....93
- Figure 5 Optical density (OD) measurements (mean \pm SD) obtained from different experimental groups at different periods of survival, showing the effects of thermal stimulus on the neuropilar areas NPA1 (**a**) and NPA2 (**b**) in the pedal ganglia of *M. abbreviatus*. In the graphs a = p<0.01 when compared with control; b = p<0.001 when compared with animals sacrificed 3 hours after stimulus; c = p<0.01 when compared with animals sacrificed 6 hours after stimulus; d = p<0.01 when compared with animals sacrificed 12 hours after stimulus (two way ANOVA, Tukey test).....94

Artigo III

- Figure 1 Photograph showing *M. abbreviatus* displaying aversive behavior when submitted to noxious stimulus (thermal stimulus). HFc, head-foot complex; HP, hot

	plate.....	117
Figure 2	<i>M. abbreviatus</i> ' response latency to hot plate stimuli, 15 min after intrahemocelic injection of saline solution, 1 µg/kg, 10 µg/kg and 25 µg/kg of L-NAME. Data are presented as mean ± SD (***) corresponds to $p < 0.001$	118
Figure 3	<i>M. abbreviatus</i> ' response latency to hot plate stimuli, 15 min after intrahemocelic injection of saline solution, 1 µg/kg, 10 µg/kg and 25 µg/kg of SNP. Data are presented as mean ± SD (***) corresponds to $p < 0.001$	119
Figure 4	<i>M. abbreviatus</i> ' response latency to thermal stimulus, 15 min after different treatments. "a" corresponds to $P < 0.05$ when compared with control. "b" corresponds to $P < 0.05$ when compared with saline. "c" corresponds to $P < 0.05$ when compared with morphine. "d" corresponds to $P < 0.001$ when compared with L-NAME. "e" corresponds to $P < 0.05$ when compared with morphine plus L-NAME. "f" corresponds to $P < 0.001$ when compared with SNP. "g" corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine plus SNP.....	120
Figure 5	<i>M. abbreviatus</i> ' response latency to chemical stimulus, 15 min after different treatments. "a" corresponds to $P < 0.005$ when compared with control. "b" corresponds to $P < 0.005$ when compared with saline. "c" corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine. "d" corresponds to $P < 0.001$ when compared with L-NAME. "e" corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine plus L-NAME. "f" corresponds to $P < 0.005$ when compared with SNP. "g" corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine plus SNP.....	121

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Grupos utilizados para determinar as doses de L-NAME e SNP a ser utilizada nos experimentos seguintes. As injeções foram realizadas 15 min antes dos animais serem submetidos ao estímulo aversivo (térmico ou químico). Para cada grupo n=10, com diferentes animais em cada grupo.....41
- Tabela 2 Tratamentos aos quais foram submetidos os grupos de animais adultos e o estímulo que receberam (15 min após a injeção). Quando os animais receberam mais de uma droga, a sequência apresentada na tabela é fiel à sequência injetada, respeitando um intervalo de 5 min entre uma injeção e outra. Neste caso, o estímulo aversivo foi aplicado 15 min após a última injeção. Para cada grupo n=20, com diferentes animais em cada grupo.....42

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um gás produzido através da ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), e age como um neurotransmissor no sistema nervoso de moluscos gastrópodos adultos. Não há informações, até o momento, da presença de neurônios contendo NOS em caracóis da espécie *Megalobulimus abbreviatus*, tanto jovens quanto adultos. Conseqüentemente, foi utilizada a técnica histoquímica da NADPH-d para mapear a distribuição nitrérgica no sistema nervoso central (SNC) de animais adultos e jovens. A reação foi observada em neurônios e fibras em todos os gânglios (pedais, pleural direito, pleural esquerdo, parietal direito, parietal esquerdo, visceral, cerebral e bucal) do SNC de caracóis jovens e adultos, e foi particularmente forte nos gânglios pedais e cerebral, onde neurônios positivos foram encontrados agrupados simetricamente nos gânglios pareados. Estes resultados fornecem evidência da existência de um sistema nitrérgico em *M. abbreviatus* jovens e adultos, onde a NOS foi encontrada em regiões específicas do SNC. Para estabelecer um possível envolvimento do NO no circuito nociceptivo neste caracol, usando histoquímica para NADPH-d e análise semiquantitativa de densidade óptica, foram caracterizados os neurônios produtores de NO nos gânglios pedais de *M. abbreviatus* jovens e adultos, sujeitos a estímulo térmico aversivo. Os animais foram sacrificados em diferentes tempos (3, 6, 12 e 24h) após o estímulo. A atividade enzimática foi detectada em diferentes grupos celulares e processos neuronais. Em todas as sub-regiões dos gânglios pedais estudadas, a densidade óptica de neurônios positivos ($p < 0,05$) e da área neuropilar 1 ($p < 0,01$) foi significativamente diferente em animais tratados quando comparados com os controles. O aumento na atividade nitrérgica induzida por estímulo nociceptivo sugere o envolvimento do NO no circuito nociceptivo de *M. abbreviatus*, o que foi verificado através do estudo da ação do NO na resposta de latência do caracol *M. abbreviatus* após estímulo térmico e químico, e na atinocicepção mediada por opióides. Doses do inibidor da NOS N^G -nitro-L-arginina-metil ester, L-NAME (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e do agente liberador de NO S-nitro-N-acetilpenicilamida, SNP (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) foram administradas para determinar o efeito do NO nas respostas de latência. Com a dose mais alta de L-NAME (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$), a resposta de latência foi significativamente maior ($p < 0,001$) e com a dose mais alta de SNP (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) a resposta de latência foi significativamente menor ($p < 0,001$) quando comparadas com as outras doses, e com os grupos controle e salina. A dose de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de L-NAME produziu um efeito analgésico similar ao da morfina. Também foi observado que a antinocicepção induzida por morfina foi significativamente potencializada por L-NAME ($p < 0,05$) e reduzida, mas não bloqueada, por SNP ($p < 0,05$) em animais submetidos aos estímulos térmico e químico, demonstrando que o NO apresenta um efeito pró nociceptivo neste modelo animal.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a gas produced through the action of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and acts as a neurotransmitter in the nervous system of adult gastropod molluscs. There appears to be no information on the presence of NOS-containing neurons in adult and young *Megalobulimus abbreviatus*. Accordingly, we used NADPH-d histochemistry to map the nitrergic distribution in the central nervous systems (CNS) of young and adult animals. The reaction was observed in neurons and fibers in all CNS ganglia of both young and adult snails (pedal, right pleural, left pleural, right parietal, left parietal, visceral, cerebral and buccal), and was particularly strong in the pedal and cerebral ganglia where positive neurons were found clustered symmetrically in the paired ganglia. These results provide evidence for the existence of a nitrergic signaling system in young and adult *M. abbreviatus* where NOS was found in specific regions of the CNS. In order to establish a probable involvement of NO in the nociceptive circuit in *M. abbreviatus*, using NADPH-d histochemistry and semi-quantitative optical densitometry, we characterized the NO-producing neurons in the pedal ganglia of young and adult *Megalobulimus abbreviatus*, subjected to aversive thermal stimulus. The animals were sacrificed at different times (3, 6, 12 and 24h) following stimulus. The enzymatic activity was detected in different cellular subsets and neuronal processes. In all the studied pedal ganglia sub-regions, the optical density of positive neurons ($p < 0.05$) and neuropilar area 1 ($p < 0.01$) was significantly different in treated animals when compared to controls. The increase in nitrergic activity induced by nociceptive stimulus suggests the involvement of NO in the nociceptive circuit of *M. abbreviatus*, which was verified through the study of the action of NO in the latency response of the snail *M. abbreviatus* after thermal and chemical stimuli, and in the antinociception mediated by opioid. Doses of the NO synthase inhibitor N^G -nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and the NO-releasing agent S-nitro-N-acetylpenicillamide, SNP (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were administered to determine the effect of NO on latency responses. With the highest L-NAME dose (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$), the response latency was significantly longer ($p < 0.001$) and with the highest SNP dose (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) the response latency was significantly shorter ($p < 0.001$) when compared with the other doses, control and saline groups. The 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose of L-NAME produced an analgesic effect similar to that of morphine. We also observed that morphine-induced antinociception was significantly potentiated by L-NAME ($p < 0.05$) and reduced, but not blocked, by SNP ($p < 0.05$) in animals submitted to thermal and chemical stimuli, showing that NO presents a pronociceptive effect in this animal model.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - NOCICEPÇÃO EM INVERTEBRADOS

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, são definidos mais pela natureza da resposta do que pela natureza física do estímulo (KAVALIERS, 1988a; CHASE, 2002).

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 (FIORITO, 1986).

Não é correto assumir que todos os animais devem ter sentimentos conscientes e sofrimento comparáveis aos humanos tanto em grau quanto em tipo, mas deve se 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

os filos “simples” de invertebrados, como por exemplo, 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 àquelas 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).

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

Exemplos adicionais do paralelo entre as respostas nociceptivas de mamíferos e moluscos são providos 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 moluscos, tais como, *Cepaea nemoralis*, *Megalobulimus sanctipauli* e *Aplysia californica* (KAVALIERS et al., 1983; WALTERS et al., 1987; KAVALIERS, 1988; ROMERO et al., 1994). No comportamento aversivo, os caracóis apresentam um comportamento bifásico (Fig. 1) acompanhada de secreção mucosa (ACHAVAL et al., 2005).

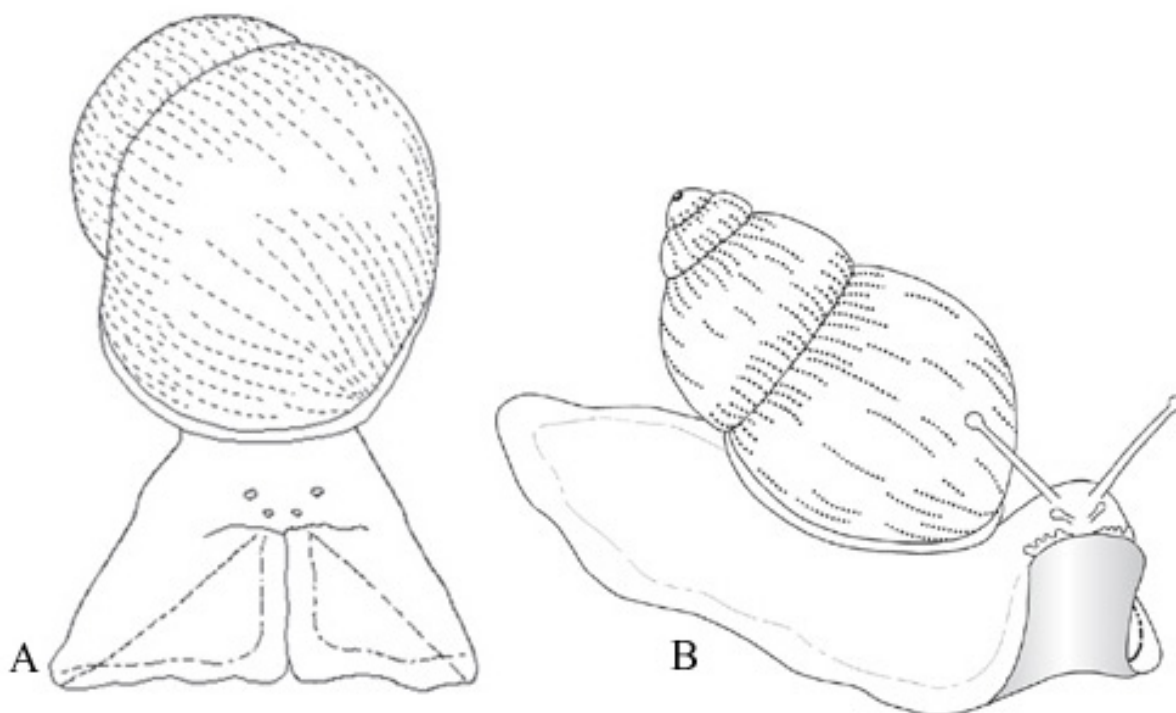


Figura 1- **A:** Representação esquemática do caracol *M. abbreviatus* na primeira fase do comportamento aversivo. Observar os tentáculos orais e palpos labiais retraídos e o aspecto triangular do complexo cabeça-pé quando o caracol é colocado na placa quente. **B:** Representação esquemática da segunda 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).

Quando submetido a um estímulo químico nocivo, como a exposição tópica à capsaicina 0,5%, o caracol *M. abbreviatus* apresenta um marcante comportamento aversivo com retração do corpo para dentro da concha, seguido de protração e elevação da região anterior do complexo cabeça-pé de maneira muito semelhante ao comportamento apresentado com estímulo térmico. Porém, as latências são mais curtas do que as obtidas com estímulo térmico a 50 °C. O comportamento de retirada da porção anterior do complexo cabeça-pé é muito mais intenso e rápido com capsaicina 0,5% do que com o estímulo térmico nocivo a 50 °C (KALIL-GASPAR et al., 2007).

A capsaicina, um produto irritante natural, é o principal ingrediente da pimenta vermelha, que provoca uma sensação de dor através da ativação seletiva de neurônios sensoriais que enviam informações sobre estímulos nocivos para o SNC (CATERINA et al., 1997). O receptor vanilóide (TRPV1) é o alvo molecular da capsaicina, a qual induz despolarização de membrana e aumenta o fluxo de cálcio, levando ao estímulo nocivo (JULIUS & BASBAUM, 2001). Este receptor também é ativado com o calor, em temperaturas maiores que 42 °C (CATERINA et al., 1997).

1.2 - CIRCUITOS NEURAIS E NOCICEPÇÃO EM INVERTEBRADOS

Estudos em *Helix lucorum* têm mostrado 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. 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 nove 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).

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 localizados nos gânglios pedais (BALABAN, 2002). Fazendo parte deste grupo, aparece um neurônio grande denominado Pd4, 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).

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, sugerindo que eles possam ser responsáveis pela modulação do comportamento de retirada, participando do circuito nociceptivo neste caracol (SWAROWSKY et al., 2005).

1.3 – MODULAÇÃO DA RESPOSTA NOCICEPTIVA EM INVERTEBRADOS

Nos vertebrados 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-se 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).

Peptídeos opióides e seus receptores 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 gastrópodos. 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 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 morfina a diferentes concentrações antes do estímulo térmico promoveu um aumento da resposta de latência no comportamento de retirada, 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 se apresentaram flácidos. Por outro lado, a administração de naloxone promoveu uma diminuição na resposta de latência do caracol, o qual exhibe 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 esta latência (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 (μ) 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, sensibilização e

comportamento de retirada após estímulo aversivo (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-AMBAKEDEREMO & WINLOW, 1994; TIERNEY, 2001).

O comportamento de *M. abbreviatus* quando tratado com 5-HT e logo após submetido a um estímulo térmico aversivo mostra 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, 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 histofluorescência usando ácido glioxílico (ZANCAN et al., 1997) e por imunistoquímica (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)

Quando testado se as respostas aversivas induzidas por capsaicina poderiam ser moduladas por morfina ou naloxone de maneira similar àquela observada em estudos anteriores com estímulo térmico aversivo, observou-se que a administração de morfina antes do estímulo químico nocivo com capsaicina promove aumento nas latências do comportamento de retirada em *M. abbreviatus*, com tentáculos orais e ópticos permanecendo parcialmente retraídos e flácidos. A administração de naloxone promove a ocorrência de um comportamento aversivo bifásico muito mais rápido do que aquele observado em animais expostos à capsaicina, sem tratamento prévio. As respostas aversivas provocadas pela capsaicina foram diminuídas por morfina. Naloxone, tanto sozinho quanto em combinação com morfina, reduz marcadamente as latências aversivas quando comparadas aos controles (KALIL-GASPAR et al., 2007). Este efeito pró-algésico do naloxone indica a presença de um mecanismo mediado por receptor opióide nas respostas induzidas por capsaicina e reforçam um papel analgésico dependente de opióides no circuito nociceptivo de *M. abbreviatus*.

1.4 – SISTEMA NERVOSO CENTRAL DO *Megalobulimus 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. 2). 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).

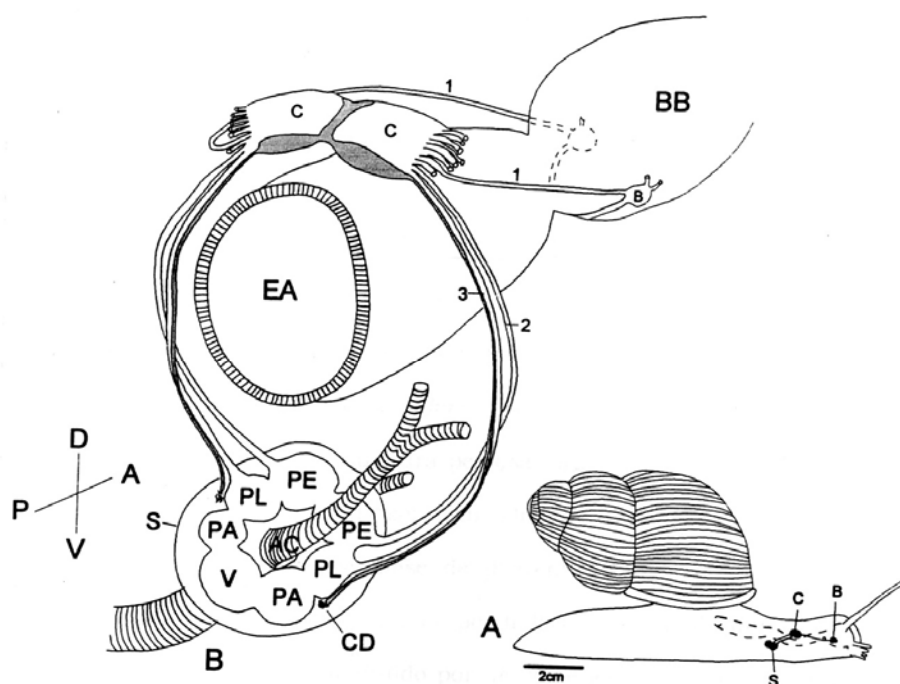


Figura 2 – A: Esboço de um caracol pulmonado, em vista lateral, locomovendo-se, para a visualização das posições relativas dos gânglios bucais (B), cerebrais (C) e do complexo ganglionar subesofageal (S), unidos entre si pelos conetivos neurais cérebro-bucal (1), cérebro-pedal (2) e cérebro-pleural (3). **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. 3-A). Os gânglios cerebrais também se encontram unidos por uma curta comissura, a comissura cerebral, e podem ser divididos em três áreas: pró-cérebro, mesocérebro e metacérebro. Este último, por sua vez, está subdividido em lobo comissural, localizado na posição póstero-medial; 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. 3-B).

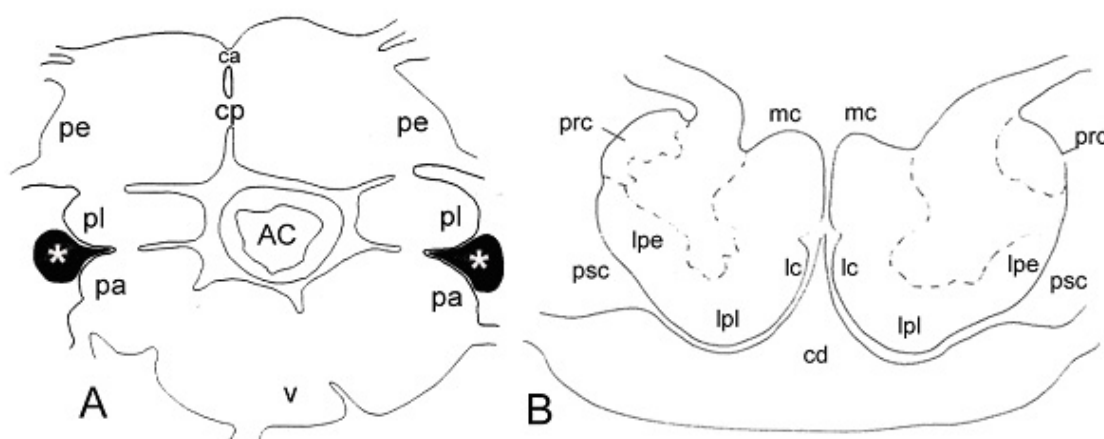


Figura 3 – A: Representação esquemática do complexo subesofageano. AC, artéria cefálica; pe, gânglio pedal; ca, comissura anterior; cp, comissura principal; pl, gânglio pleural; pa, gânglio parietal; v, gânglio visceral; prolongamento do corpo dorsal (asterisco branco). **B:** Representação esquemática do gânglio cerebral. mc, mesocérebro; prc, pró-cérebro; psc, metacérebro; lpe, lobo pedal; lpl, lobo pleural; lc, lobo comissural; cd, corpo dorsal. A este nível de secção não se observa a comissura cerebral (Adaptado de Zancan, 1996).

1.5 – MEDIADORES QUÍMICOS NO SNC DO *Megalobulimus abbreviatus*

Os mediadores químicos estão divididos em duas classes gerais de sinalizadores: as aminas, que são sintetizadas diretamente de aminoácidos e formadas por reações relativamente simples, e os peptídeos, que são transcritos 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 nematodos, anelídeos e moluscos (WALKER & HOLDEN-DYE, 1989). 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). 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 se observou 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. 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 apresentaram 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).

Outro neurotransmissor importante nos invertebrados é a serotonina (5-HT), a qual é encontrada tanto no sistema nervoso central (SNC) como no periférico, tendo funções biológicas específicas como neurotransmissor, neuromodulador e neuromônio. Nos mamíferos a 5-HT desempenha importante papel sobre a inibição da transmissão nociceptiva ao nível das vias descendentes bulbo-espinhais, por sua ação localizada sobre os nociceptores. No SNC de humanos a 5-HT atua como modulador do humor, do apetite, da temperatura corporal, da secreção neuroendócrina, do sono e da nocicepção, além de estar envolvida em uma série de distúrbios psiquiátricos. Em diversos gastrópodes, a 5-HT tem função neurotransmissora e neuromoduladora no SNC e desempenha uma importante função nas condições homeostáticas

básicas nesses animais, tais como alimentação, comportamento reprodutor, locomoção, secreção neuro-hormonal, função cardiovascular, aprendizado, sensibilização e reflexo de retirada (PANCHIN et al., 1996; ZANCAN, 1996; ZANCAN et al., 1997).

Existem evidências que peptídeos estejam envolvidos em vários aspectos relacionados à nocicepção, e conseqüentemente às respostas aos estímulos nocivos, tanto em invertebrados quanto vertebrados. Os peptídeos 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. São classificados em famílias por possuírem seqüências de aminoácidos e ações semelhantes. Dentre estas famílias podem-se destacar as taquicininas, secretinas, insulinas, gastrinas e opióides (KANDEL et al., 2000).

Os peptídeos pertencentes a família dos opióides - encefalinas, dinorfinas, opiocortinas, assim como FMRFamida (KANDEL et al., 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-NH₂) foi descoberto inicialmente no gânglios do bivalve *Macrocallista nimbosa*, e desde então uma variedade de peptídeos 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 à nocicepção (KAVALIERS, 1988a). Também as encefalinas 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). Outro neuropeptídeo amplamente detectado em animais 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 anti-nociceptiva, e também nas respostas cardiovasculares (vasoativas) provocadas na medula espinhal (HELKE et al., 1990).

Estudos prévios realizados em nosso laboratório com *M. abbreviatus* indicaram a presença de neurônios colinérgicos, monoaminérgicos (catecolaminérgicos e serotoninérgicos) e peptidérgicos no SNC deste animal, envolvidos em várias funções fisiológicas (ZANCAN et al., 1994; ZANCAN, 1996; ZANCAN et al., 1997; MORIGUCHI-JECKEL, 2001; FACCIONI-HEUSER et al., 2004). Além disso, foram detectadas variações na expressão serotoninérgica em neurônios e áreas neuropilares dos gânglios pedais após estimulação térmica aversiva, sugerindo o envolvimento da 5-HT no circuito nociceptivo de *Megalobulimus abbreviatus* (SWAROWSKY et al., 2005).

1.6- ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é um gás que se comporta como um radical livre, que além de outras funções, modula a neurotransmissão e está envolvido em diferentes comportamentos e nos processos de aprendizado e memória em vertebrados e invertebrados (MOROZ et al., 1993; GELPERIN, 1994; VINCENT, 1994; ELPHICK et al., 1995; GARTHWAITE & BOULTON, 1995; TEYKE, 1996). Ele foi primeiramente descoberto como a molécula responsável pelas ações tumorais e bactericidas dos macrófagos (GREEN et al., 1981a; GREEN et al., 1981b; HIBBS et al., 1987; STUEHR et al., 1989). Subsequentemente foi demonstrado que o NO representava um fator de relaxamento derivado do endotélio que mediava a habilidade de substâncias, tais como a acetilcolina e a bradicinina, de dilatar vasos sanguíneos (IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1987). Essas ações despertaram o interesse da possibilidade de que o NO poderia ser formado no encéfalo, sendo essa evidência obtida em culturas de células

cerebelares (GARTHWAITE et al., 1988). A presença de uma enzima formadora de NO (NO sintase, ou NOS), também no encéfalo, foi mais tarde confirmada (KNOWLES et al., 1989), e esta enzima foi subsequentemente purificada e seu DNA foi clonado e sequenciado (BREDT et al., 1991).

A regulação da síntese do NO é de fundamental importância, uma vez que o NO não pode ser armazenado, liberado ou inativado, após sua liberação na sinapse, por nenhum dos mecanismos regulatórios convencionais (BREDT & SNYDER, 1994). Além disso, o NO extrapola muitos critérios clássicos de um neurotransmissor. Por exemplo, neurotransmissores são usualmente armazenados em vesículas e liberados por exocitose. Já o NO é formado de acordo com a demanda e simplesmente se difunde entre as células (JAFFREY & SNYDER, 1995). Outro aspecto importante é que os neurotransmissores geralmente agem em locais receptores específicos nas membranas de células adjacentes, enquanto que o NO se difunde para dentro das células adjacentes e se liga a inúmeras proteínas que servem como alvos receptores, como a guanilil ciclase. Sendo assim, o NO possui uma grande habilidade para se difundir através das membranas, permitindo uma rápida movimentação em todas as direções, desde o local de sua síntese (XIE et al., 2002). Além disso, neurotransmissores podem ser inativados por mecanismos enzimáticos ou de recaptção, enquanto que o NO é inativado por reações químicas com outras moléculas, como o superóxido (JAFFREY & SNYDER, 1995).

A quantidade de NO produzido depende da atividade da enzima NOS. Uma vez que, o NO não pode ser estocado em neurônios, a regulação da atividade desta enzima é de crucial importância. O NO tem um curto período de meia-vida (segundos) e é rapidamente oxidado em produtos finais estáveis e inativos, como nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) (LOU & CIZKOVA, 2000).

A NOS catalisa a reação de L-arginina e O_2 a L-citrulina e NO (VINCENT, 1994) (Fig. 4).

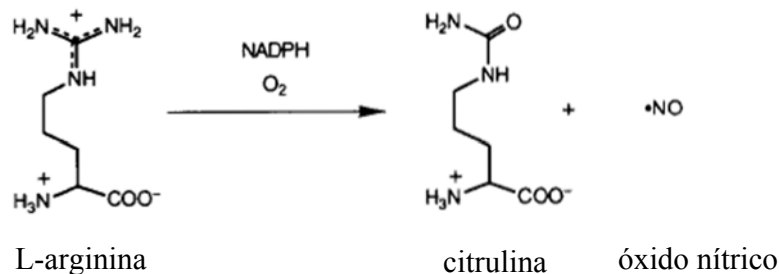


Figura 4. Reação catalisada pela óxido nítrico sintase (Marletta, 1993)

Após essa descoberta, duas classes distintas de NOS foram identificadas: a NOS constitutiva cálcio/calmodulina dependente (c-NOS) e a NOS induzível cálcio-independente (iNOS, NOS2; (MONCADA et al., 1991). Foram também descritas duas isoformas de cNOS, chamadas NOS endotelial (eNOS, NOS3) e NOS neuronal (nNOS, NOS1). A nNOS é a mais abundante isoforma presente no encéfalo, e é co-localizada com neurônios marcados com nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato em sua forma reduzida (NADPH) diaforase (NADPH-d). Todos os tipos de NOS requerem NADPH e O_2 como co-substratos para a sua reação (MARLETTA, 1993). Os primeiros neurônios marcados com a técnica da NADPH-d foram identificados por Thomas e Pearse em 1961 e 1964, que descobriram neurônios que se marcavam de azul escuro na presença de azul de nitrotetrazólio (*nitro blue tetrazolium*, NBT) e NADPH. A atividade da nNOS depende também de outros cofatores, tais como, flavina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e tetrahydro-L biopterina (BH4) (BREDT & SNYDER, 1994; VINCENT, 1994; LOU & CIZKOVA, 2000). nNOS foi originalmente encontrada em neurônios, mas também tem sido identificada em outros tecidos como músculo esquelético e cardíaco. eNOS foi inicialmente identificada em células endoteliais,

e estudos recentes sugerem a existência do gene para eNOS em neurônios, apontando para a participação desta isoforma na transmissão sináptica (LOU & CIZKOVA, 2000).

As isoformas nNOS e eNOS são constitutivamente expressas e sua ativação enzimática requer a estimulação de vias de sinalização dependentes de cálcio/calmodulina. iNOS não é tipicamente expressa em células em repouso, porém sua expressão é induzida em uma grande variedade de tecidos e células por citocinas, produtos microbianos ou lipopolissacarídeos (LPS), e sua atividade independe de níveis de cálcio intracelular (LOU & CIZKOVA, 2000).

A formação da nNOS é estimulada em resposta ao aumento de níveis intracelulares de cálcio. No encéfalo, o glutamato agindo em receptores NMDA desencadeia um influxo de cálcio que se liga com a calmodulina para ativar a NOS. Dessa maneira, o glutamato pode triplicar a atividade da NOS em fatias de encéfalo em questão de segundos, o que gerou um novo modelo de transdução sináptica (BREDT & SNYDER, 1989).

Paralelamente aos estudos realizados no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, foram-se acumulando evidências que NOS também se expressa no sistema nervoso de diferentes invertebrados, indicando que a via de sinalização do NO é filogeneticamente estendida e conservada através da evolução (DI COSMO et al., 2000; PALUMBO, 2005). O procedimento histoquímico para detectar atividade NADPH-d e/ou a detecção imunohistoquímica para localizar NOS foram utilizadas em diferentes espécies de invertebrados. Entre os moluscos gastrópodes foram estudados em *Limax maximus* (GELPERIN, 1994), *Helix aspersa* (COOKE et al., 1994), *Helix pomatia* (HUANG et al., 1997), *Lymnaea stagnalis* (MOROZ et al., 1993; 1994). Além disso, existem evidências fisiológicas da atividade do NO: na locomoção em *Clione limacina* (MOROZ et al., 2000), na regulação da liberação de acetilcolina em *Aplysia* (MEULEMANS et al., 1995), na modulação da antinocicepção em *Cepaea nemoralis* (KAVALIERS et al., 1998), no mecanismo de defesa em *Mytilus edulis* (STEFFANO & OTTAVIANI, 2002), na memória em

Aplysia (KATZOFF et al., 2002), na facilitação sináptica em *Helix lucorum* (MALYSHEV & BALABAN, 1999), na regulação do funcionamento do sistema serotoninérgico, como segundo mensageiro, atuando como um co-transmissor com 5-HT nas aferências sinápticas em *Helix lucorum* (D'YAKONOVA, 2002), no comportamento alimentar em *Lymnaea stagnalis* (STRAUB et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2000; SADAMOTO et al., 1998), em *Pleurobranchaea californica* (MOROZ & GILLETTE, 1996), e em *Clione limacina* (MOROZ et al., 2000). Nos moluscos cefalópodos foram realizados também vários estudos sobre o NO como, por exemplo, no comportamento de defesa em *Sepia officinalis* onde está envolvido “o sistema de defesa da tinta” adotado pelo animal para confundir ao predador, e a sinalização do NO mediada pelo GMPc no cérebro de *Sepia* está envolvido nos mecanismos redox e particularmente na nitração protéica (DI COSMO et al., 2000; PALUMBO, 2005).

Nos invertebrados, diferentemente dos vertebrados, encontrou-se que em *Helix aspersa* a distribuição de neurônios NOSir diferem em sua localização com os neurônios com atividade NADPH-d (COOKE et al., 1994). Peruzzi e colaboradores (2004), estudando o papel do NO no SNC de *Planorbarius corneus* e a possível implicação da comunicação neurônio-microglia, marcaram os neurônios, em cortes alternados, tanto com o procedimento histoquímico para detectar a atividade NADPH-d, assim como, com o procedimento imunoistoquímico para visualizar nNOS e iNOS. Neles tampouco encontraram uma completa superposição dos neurônios marcados pelas duas reações. Existe 60% de co-localização entre nNOS e NADPH-d, no entanto, 40% foram somente NADPH-d positivos. Quando estudada a diaforase e a iNOS após estimulação com diferentes ativadores (ATP, lipopolissacarídeos) encontrou-se 80% de superposição entre as duas reações, esta diferença na co-localização provavelmente deve-se ao fato que o procedimento para detectar diaforase não distingue as duas isoformas de NOS, e que

os 20% restantes de neurônios NADPH-d positivos poderiam somente ser explicados pela presença de diferentes enzimas NADPH-d (BEESLEY, 1995; PERUZZI et al., 2004).

Também foi encontrado no SNC de *Helix pomatia* uma distribuição complementar entre a atividade NADPH-d e a imunorreatividade à L-arginina, a NADPH-d também se co-expressa com a imunomarcção da L--citrulina, após aumento do Ca^{++} intracelular, sugerindo que os neurônios produtores de NO são os mesmos que contêm L-arginina (XIE et al., 2002).

Os neurônios imunorreativos a nNOS (nNOS-ir) no SNC de *Helix aspersa* encontraram-se principalmente nos gânglios cerebral e pedal, entretanto, as fibras imunorreativas foram identificadas apenas em locais restritos, como no neuropilo dos gânglios centrais e nas fibras dos conectivos interganglionares. No entanto, os nervos periféricos não apresentaram imunomarcção. Deste modo concluiu-se que os neurônios nNOS-ir seriam interneurônios (COOKE et al., 1994). Em *Helix pomatia* foram encontrados agrupamentos neuronais com atividade NADPH-d em todos os gânglios centrais, assim como uma distribuição semelhante dos neurônios nNOS-ir, sendo esta co-localização em torno de 60% (HUANG et al., 1997). A atividade NADPH-d também foi estudada em diferentes caracóis opistobrânquios tais como *Pleurobranchaea californica*, *Aplysia californica*, *Tritonia diomedea* e nos cefalópodos *Sepia officinalis* e *Rossia pacifica*. Todos os opistobrânquios mostraram escassos neurônios positivos (cerca de 50 somas com reação fraca e 10 com reação intensa) nos gânglios centrais. Por outro lado, em *Pleurobranchaea* mais de 500 neurônios apresentaram reação forte, a maioria deles localizavam-se nos gânglios pedais, bucais e cérebro-pleurais (MOROZ et al., 1996).

Estudos feitos em *Pleurobranchaea californica* e *Aplysia* (MOROZ et al., 1996) demonstraram que a conversão de arginina em citrulina é dependente de NADPH, dependência esta que foi suprimida com o emprego de um inibidor da calmodulina, a trifluoperazina (TFP). No entanto, a produção da citrulina não se modifica pela omissão do Ca^{++} , com a utilização de

um quelante de cálcio, como o ácido etileno glicol tetracético (EGTA), mas foi inibida pela utilização de um inibidor da NOS, o N⁰-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), e não por adição da forma destrógrira do mesmo composto (ELPHICK et al., 1995).

A ausência de dependência de Ca⁺⁺ na NOS dos moluscos estudados contrasta com a forte dependência de Ca⁺⁺/calmodulina encontrada em artrópodos e nas isoformas neuronal e endotelial de NOS em mamíferos (ELPHICK et al., 1995). No entanto, a susceptibilidade da atividade enzimática a TFP sugere que a NOS dos moluscos seria semelhante à forma induzível de NOS em mamíferos e poderia unir-se constitutivamente à calmodulina como um forte cofator sem Ca⁺⁺ (KNOWLES & MONCADA, 1994).

As características da atividade da NOS em *Pleurobranchaea* sugerem que a enzima é uma isoforma nova, no que tange à combinação, a sua origem neuronal, localização subcelular, sua sensibilidade aos bloqueadores de calmodulina, insensibilidade ao Ca⁺⁺, e sua natureza constitutiva. Nos invertebrados outras isoformas constitutivas de NOS independentes de Ca⁺⁺ foram descritas em tecidos não neurais. Em mamíferos algumas isoformas induzíveis são semelhantes às encontradas em *Pleurobranchaea*, como as das células granulares do cerebelo e tecidos não neurais, como a microglia e hepatócitos que são Ca⁺⁺ independentes, mas dependentes da calmodulina (MOROZ et al., 1996).

Após estimulação nociceptiva periférica no rato (VETTER et al., 2001) e no caracol terrestre *Cepaea nemoralis* (KAVALIERS et al., 1998) e axotomia na tartaruga *Trachemys dorbigni* (PARTATA et al., 1999), foi demonstrado um envolvimento do NO no circuito nociceptivo. Foi observado que o NO e a NOS modulam a antinocicepção induzida por opióides e os efeitos inibitórios da exposição a um campo magnético de 60-HZ no caracol terrestre *Cepaea nemoralis*. A administração do inibidor competitivo L-NAME induz antinocicepção, enquanto

que a administração de um agente liberador de NO, a S-nitro-N-acetil-penicilamida (SNP) provoca uma redução da antinocicepção em *Cepaea nemoralis* (KAVALIERS et al., 1998). Esses dados dão apoio e ampliam os resultados de vários estudos realizados em ratos e camundongos que mostraram que a inibição da NOS aumenta a analgesia mediada por opióides (MACHELSKA et al., 1997; PRZEWLOCKI et al., 1993).

1.7- ÓXIDO NÍTRICO E NOCICEPÇÃO

Ainda que as consequências biológicas da produção de NO e seus alvos celulares não sejam totalmente compreendidos, suas funções patológicas e fisiológicas estão sendo descobertas rapidamente. Muitas evidências indicam que a ativação nociceptiva aferente, como no caso de injúria de nervo periférico e inflamação, resulta em sensibilização central, que é mediada pela ativação de receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), que podem levar à produção de NO. A ativação de receptores espinhais do tipo NMDA por aumento da liberação pré-sináptica de glutamato resulta em um aumento do cálcio intracelular e estimulação da NOS cálcio/calmodulina dependente. Os efeitos biológicos do NO podem ser mediados através da interação direta com seus alvos ou da ativação da guanilato ciclase solúvel e subsequente produção de guanosina monofostato cíclico (GMPc) (LOU & CIZKOVA, 2000).

Estados hiperalgésicos envolvem uma produção de NO dependente de cálcio. Assim, qualquer aumento na concentração intracelular de GMPc pode produzir alodinia (SOUZA & PRADO, 2001). Efeitos benéficos no manejo da dor têm sido obtidos em algumas desordens através da inibição da produção de NO, mas em outros casos através do aumento de sua produção. Compreender o papel do NO em uma determinada condição, então, é

fundamentalmente importante para desvendar o papel do NO na nocicepção (LOU & CIZKOVA, 2000).

Mesmo que o NO provavelmente não seja um mediador na transdução de estímulos periféricos sob condições fisiológicas (LIN et al., 1999), muitos estudos farmacológicos e imunoistoquímicos tem sugerido que o NO está envolvido nos estados de dor após o dano tecidual. A inibição da produção de NO por inibidores da NOS na maioria dos casos resulta na supressão da hiperalgesia induzida por dano tecidual ou estimulação química. Assim, o NO modula a hiperexcitabilidade de neurônios do corno dorsal da medula e exerce um papel pró-nociceptivo nestes estados de nocicepção. Esta hipótese está de acordo com os dados de que os níveis da proteína NOS estão aumentados em vários modelos animais de dor (LOU & CIZKOVA, 2000).

Alguns estudos, porém, tem sugerido que o NO pode não exercer um papel pró-nociceptivo nos estados de dor (BUDZINSKY et al., 2000). Uma redução, mas não um aumento, da expressão de NOS tem sido registrado associado com hiperalgesia induzida por inflamação crônica (DOLAN et al., 2000). Estas discrepâncias podem ser explicadas pelos achados *in vitro* de que a expressão da NOS nos neurônios da medula espinhal, que finalmente leva à produção de NO, é diferencialmente regulada pela ativação de diferentes fibras aferentes, bem como pela intensidade e duração das aferências nociceptivas (CALLSEN-CENCIC et al., 1999). Então, é provável que o ambiente em torno do local do dano, a severidade da inflamação, tipos de citocinas liberadas e assim por diante, podem ativar aferentes primários com diferente intensidade, resultando em regulação diferencial da expressão do gene para NOS (LOU & CIZKOVA, 2000).

Outra explicação para as discrepâncias referentes ao papel do NO na nocicepção induzida por danos teciduais é que o NO pode ser uma molécula mensageira de diferentes tipos de

neurônios, incluindo neurônios excitatórios e interneurônios inibitórios (VALTSCHANOFF et al., 1992; BOGDANOV & WURTMAN, 1997). Dependendo do tipo de neurônio ativado após uma lesão específica, a influência na produção diferenciada de NO na nocicepção pode variar entre modelos de dor animal e doenças humanas. Isto é, a ativação de neurônios excitatórios induzida por NO na via nociceptiva pode resultar em hiperalgesia, ao passo que a ativação de interneurônios inibitórios induzida por NO pode causar hipoalgesia (LOU & CIZKOVA, 2000). Estes dados estão de acordo com estudos *in vitro* de que o NO pode exercer um duplo papel na mediação da atividade neuronal, podendo aumentar a atividade neuronal na medula espinal durante a inflamação (HALEY et al., 1992) ou diminuir a responsividade dos neurônios espinhais aos estímulos nocivos (ZHUO et al., 1993). Além disso, o NO produzido em um tipo de neurônio pode difundir e influenciar neurônios próximos que podem ter propriedades opostas (excitatória ou inibitória) e formar contatos sinápticos com neurônios produtores de NO. Assim, a ativação dos neurônios circundantes induzida por NO pode promover uma regulação positiva ou negativa através de alças de *feedaback* sobre os neurônios primários produtores de NO (LOU & CIZKOVA, 2000).

Em mamíferos o NO age como um segundo mensageiro que ativa a guanilato ciclase e então aumenta a síntese de GMPc. Muitas evidências têm mostrado que o NO e o GMPc estão envolvidos no processo nociceptivo, mas a controvérsia a respeito dos efeitos pró ou antinociceptivos do NO e do GMPc também estão presentes quando se trata da análise desta via. Possíveis explicações para estas aparentes discrepâncias são que o GMPc, assim como o NO, também tem diferentes ações na atividade e excitabilidade neuronal em níveis espinhais e supra-espinhais e diferentes efeitos anti ou pró-nociceptivos dependendo da sua concentração. O NO pode induzir efeitos pró-nociceptivos em altas concentrações e anti-nociceptivos em baixas concentrações (HOHEISEL et al., 2005; ZAKARIA et al., 2005).

Pelo fato da atividade do NO ser intimamente controlada por uma família de genes da NOS, cuja expressão está sujeita à regulação diferencial em tipos celulares específicos e sob estímulos específicos, o papel do NO na nocicepção pode ser mais complicado do que se espera. Dados existentes sugerem que a via NO-GMPc é importante na sensitização central induzida por dano tecidual, provavelmente através de mecanismos mediados pela modulação de circuitos espinhais excitatórios e inibitórios. Entretanto, vias que não envolvam o GMPc podem também participar na nocicepção mediada por NO (LOU & CIZKOVA, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Sabe-se que um dos maiores desafios das neurociências é a identificação funcional de neurônios envolvidos nos circuitos básicos de certos comportamentos, inclusive da nocicepção. Com o objetivo de darmos continuidade à caracterização dos neurônios do SNC do modelo experimental estabelecido em nosso laboratório, o caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus*, e sabendo que o NO e sua enzima de síntese, a NOS, expressam-se muito inicialmente na filogenia, foi analisada a expressão e a distribuição do óxido nítrico utilizando o procedimento histoquímico da NADPH diaforase. Sabendo que um estímulo térmico a 50 °C é aversivo para o caracol *M. abbreviatus*, foram observados os efeitos da estimulação térmica aversiva na expressão do óxido nítrico no SNC desta espécie após diferentes tempos de estimulação térmica, mediante o mesmo procedimento de histoquímica. Também foram estudados os efeitos de L-NAME, inibidor de NOS, assim como, do doador de ON, SNP, na antinocicepção mediado por opióides induzida por morfina após a resposta térmica e química.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Localizar mediante o procedimento histoquímico da NADPH-diaforase subpopulações neuronais produtoras de óxido nítrico no SNC de *M. abbreviatus* jovens e adultos;
- Estudar semiquantitativamente as prováveis variações na atividade da enzima de síntese do NO, a óxido nítrico sintase (NOS), através da técnica da NADPH-diaforase, no gânglio pedal de animais jovens e adultos controle e tratados (estimulação

térmica aversiva) em diferentes tempos, utilizando o procedimento de densitometria óptica;

- Observar os efeitos do inibidor da NOS, L-NAME, bem como do doador de ON, o SNP, na resposta de latência aos estímulos térmico (placa quente) e químico (capsaicina tópica), bem como na antinocicepção mediada por opióides induzida por morfina durante os estímulos térmico e químico em animais adultos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, será feita uma breve descrição da abordagem metodológica utilizada em cada um dos trabalhos que compõem esta tese. A descrição completa dos materiais e métodos utilizados encontra-se no corpo de cada trabalho nos capítulos de Artigos submetidos e/ou aceitos para publicação.

Todos os animais utilizados foram caracóis jovens e/ou adultos *Megalobulimus abbreviatus* coletados no município de Charqueadas, RS, mantidos em terrários telados com ciclo claro/escuro de 12 h, temperatura controlada (20-25 °C), e alimentados com alface e água *ad libitum*. Os animais utilizados foram coletados em diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão).

Os animais adultos foram identificados pela presença da borda da concha “virada”, de coloração rósea, com média do comprimento da concha variando de 7.5 ± 0.5 cm de comprimento e de 4.0 ± 0.2 cm e peso variando entre 41 – 78 g (Fig. 5). Os animais jovens não apresentaram a borda rósea na concha e a média de tamanho das mesmas variou entre 4.0 ± 0.2 cm de comprimento e de 2.9 ± 0.3 cm, com peso variando entre 12 – 24 g (Fig. 6).

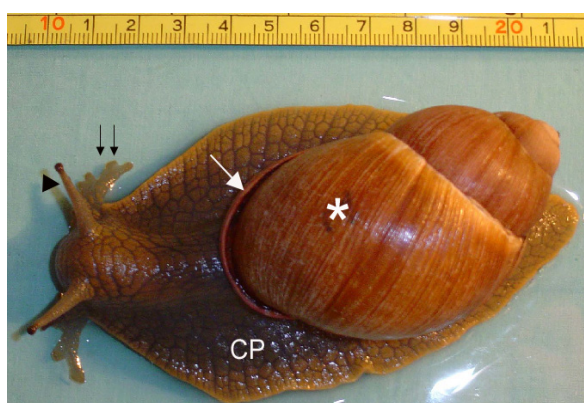


Figura 5 – Animal adulto utilizado para experimentação. CP, complexo cabeça-pé; asterisco, concha; seta, borda virada de coloração rósea; cabeça de seta, tentáculos posteriores; seta dupla, palpos labiais.



Figura 6 – Animal jovem utilizado para experimentação. CP, complexo cabeça-pé; asterisco, concha.

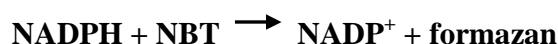
Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante o dia, no período entre 14h e 17h, para eliminar variáveis, pois as espécies de gastrópodos terrestres apresentam hábitos noturnos (CHASE, 2002). Todos os procedimentos aplicados estiveram de acordo com as Leis Brasileiras de cuidado e pesquisa animal (Lei nº 11.794).

3.1 – ARTIGO I

3.1.1- Procedimento histoquímico para detecção de atividade NADPH-diaforase

Nesse experimento foi realizada a técnica histoquímica da NADPH-diaforase (enzima citosólica dihidronicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) – NADPH-d (adaptada de CARRILLO et al., 2007). Esta técnica utiliza NADPH como substrato e azul de nitrotetrazólio, *nitro blue tetrazolium* (NBT), como cromógeno (que é amarelo), gerando um precipitado azul escuro insolúvel, denominado formazan pela liberação de elétrons.

Atualmente sabe-se que a enzima NADPH-d é responsável por catalizar a seguinte reação (HOPE & VINCENT, 1989):



Foram utilizados 6 caracóis adultos e 6 caracóis jovens para a descrição das subpopulações neuronais produtoras de NO. Os animais foram anestesiados em uma solução saturada de mentol (Synth, Brasil) em salina para *M. abbreviatus* durante 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 digestório. 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. Os gânglios bucais, localizados ventralmente ao bulbo bucal também foram removidos. 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. Todo o material removido foi fixado por imersão em paraformaldeído 4%, diluído em tampão fosfato (TF) 0,1M pH 7,4, por 4 horas à temperatura ambiente. Após fixação, o material foi crioprottegido 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. Os gânglios nervosos centrais fixados e crioprotégidos foram orientados para cortes coronais (gânglios cerebrais) e horizontais – sentido dorso-ventral (gânglios bucais e 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 (Synth, Brasil) 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), sendo as secções recolhidas em TF 0,1M pH 7,4 e processados para o procedimento histoquímico. Foi realizada uma pré-incubação dos cortes à temperatura ambiente por 10 min em uma solução contendo 12µL de Triton X-100 (Sigma, USA) diluído em 100 mL de TF 0,1M pH 7,4. Após, os cortes foram incubados a 37 °C em uma solução contendo 5 mg de NADPH (Sigma) e 3 mg de NBT (Sigma, USA), diluídos em TF 0,1M pH 7,4. O tempo de incubação dos cortes a 37 °C foi de 1 h e 30 min. Após a reação, os cortes foram lavados com TF 0,1M pH 7,4, montados em lâminas gelatinizadas, desidratados em uma série alcoólica crescente, diafanizados em xilol e cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas.

Todos os gânglios utilizados foram fixados durante o mesmo período de tempo em soluções idênticas. Foram igualmente processados ao mesmo tempo, seguindo-se exatamente os mesmos passos histológicos, bem como incubados nos mesmos meios, pelo mesmo período de tempo. Esses procedimentos foram realizados a fim de reduzir a possibilidade de *over reaction*, diferenças na reação do cromógeno ou alterações nos níveis de fundo dos grupos experimentais.

O controle da técnica foi feito através da incubação de alguns cortes sem substrato.

3.2 – ARTIGO II

3.2.1- Estímulo térmico aversivo

Neste experimento foram utilizados 25 caracóis adultos e 25 caracóis jovens, *M. abbreviatus*. Os animais (jovens e adultos) foram divididos em 4 grupos de 5 caracóis e receberam um estímulo térmico aversivo de 50 °C em uma placa quente (Socrel, modelo-DS37, Comerio, VA, Itália) (Fig. 7), e foram sacrificados 3, 6, 12 e 24 horas após o estímulo. O grupo controle (5 caracóis adultos e 5 caracóis jovens) não foi submetido ao estímulo térmico.



Figura 7 – 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 (ACHAVAL et al., 2005; SWAROWSKY et al., 2005). 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; SWAROWSKY *et al.* 2005). A seguir, os caracóis foram rapidamente removidos da placa quente e devolvidos aos terrários até o momento do sacrifício dos mesmos, onde permaneciam nas mesmas condições ambientais e de alimentação anteriores ao estímulo. Todos os procedimentos experimentais foram realizados durante o dia (14-17h), para eliminar variáveis, pois os gastrópodos terrestres apresentam hábitos noturnos (CHASE, 2002).

3.2.2- Procedimento histoquímico para detecção de atividade NADPH-diaforase

Para visualizar os neurônios que produzem óxido nítrico, a técnica histoquímica da NADPH-diaforase foi utilizada. O sacrifício dos animais, fixação do material e realização da técnica foram feitos como descritos para o experimento do artigo I.

3.2.3. Aquisição de dados

A atividade da NADPH-d foi avaliada usando densitometria óptica regional e neuronal (SWAROWSKY *et al.*, 2005; XAVIER *et al.*, 2005; VASCHENKO, KOTSYUBA 2008; VIOLA *et al.*, 2009).

O protocolo para medir a densidade óptica da atividade da NADPH-d nos gânglios pedais foi baseado no estudo realizado previamente por Swarowsky e colaboradores (2005). A intensidade do produto da reação da atividade a NADPH-d foi estudada por uma análise semi-quantitativa usando um microscópio Nikon Eclipse E-600 (10x) acoplado a uma câmera CCD “Pro-Series High Performance” e o programa “Image Pro Plus Software 6.0” (Media Cybernetics, EUA). As seções foram analisadas e as imagens de diferentes regiões dos gânglios pedais foram capturadas, digitalizadas e convertidas para tons de cinza (0-255; sendo, 0 = branco absoluto e 255

= negro absoluto). Quadros com $15.050 \mu\text{m}^2$ (como área de interesse, AOI) foram colocados sobre os grupos neuronais anteriores, mediais, laterais e posteriores e sobre as áreas neuropilares (NPA1 e NPA2; SWAROWSKY et al., 2005) dos gânglios pedais. Foram analisadas pelo menos 5 secções de cada região dos gânglios pedais, e de cada secção, pelo menos 3 áreas diferentes tiveram suas medidas estudadas de densitometria. Para medir a densidade óptica neuronal, uma AOI de $280 \mu\text{m}^2$ foi colocada sobre o citoplasma de alguns neurônios (5 células em cada região dos gânglios; pelo menos 5 secções em cada grupo). 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. Artefatos evidentes foram evitados. Além disso, para realizar a densitometria, foi necessário que todo o procedimento histoquímico de cada experimento fosse realizado com todos os grupos ao mesmo tempo, para eliminar variáveis.

Uma área de tecido livre foi determinada e utilizada para corrigir as medidas de densidade óptica, servindo como imagem de background. Foi realizada a subtração de cada fundo marcado com o fundo de correção (XAVIER et al., 2005).

A densidade óptica regional e neuronal por campo, em uma calibração padrão, foi obtida pela fórmula:

$$\mathbf{DO(x,y) = -\log [(Intensidade(x,y) - NA / Incidente - NA)],}$$

onde: DO = densidade óptica; (x,y) = coordenadas do “pixel” analisado; Intensidade = intensidade de luz visível no “pixel” ; Incidente = intensidade de luz que incide sobre o pixel; e NA= negro absoluto.

3.2.4. Análise Estatística

Os dados referentes à densitometria óptica regional e a densitometria óptica neuronal da atividade da NADPH-d, foram comparados através da análise da variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Tukey e o nível estatístico foi estabelecido a $P < 0,05$.

3.3 – ARTIGO III

3.3.1 – Preparo das soluções e injeção

Capsaicina 0,5% (Sigma, USA) foi dissolvida em dimetil sulfóxido (DMSO; VETEC, Brasil), conforme protocolo publicado em experimentos anteriores na espécie em estudo (Kalil-Gaspar et al., 2007). L-NAME (Sigma; USA) e SNP (Sigma; USA) foram dissolvidos em salina para a espécie (5g/L NaCl, 0.08g/L KCl, 0.06g/LCaCl₂) para as concentrações desejadas (1 µg/kg, 10 µg/kg e 25 µg/kg). Sulfato de morfina (10mg/mL) (Cristália do Brasil S/A, São Paulo, SP, Brasil) não necessitou diluição.

As drogas e solução salina foram injetadas na cavidade hemocélica dos animais através da zona anterior ventral do pé 15 min antes do estímulo aversivo. Todos os animais foram utilizados apenas uma vez em cada experimento.

3.3.2- Estímulo térmico aversivo

O estímulo térmico aversivo ao qual os animais foram submetidos segue o mesmo protocolo descrito anteriormente para o artigo II.

3.3.3- Estímulo químico aversivo

Caracóis hidratados individualmente receberam um estímulo químico com uma solução de capsaicina 0,5%. Os animais foram colocados em placas de Petri (10 cm de diâmetro), a uma temperatura ambiente de 22 °C, contendo um filme aquoso de capsaicina (KALIL-GASPAR et al., 2007). O limiar nociceptivo dos caracóis foi individualmente determinado por aferição da latência de seus comportamentos aversivo ou de retirada ao estímulo térmico. A aferição da latência iniciou-se no momento em que o caracol foi colocado na placa de Petri e terminou

imediatamente após o animal elevar o complexo CP a, no mínimo, 1 cm da placa. A seguir, os caracóis foram rapidamente removidos da placa e lavados em água corrente para evitar exposição excessiva à solução de capsaicina (KALIL-GASPAR et al., 2007).

3.3.4- Procedimentos experimentais para determinação dos efeitos de L-NAME e SNP

O estudo foi dividido em duas fases. A primeira fase teve como objetivo determinar a dose efetiva de L-NAME e SNP que promovesse respostas de latência significativamente diferentes dos animais controle e salina. Para testar se L-NAME e SNP seriam capazes de evocar efeitos anti ou pró-nociceptivos, animais adultos (n=10 em todos os casos, com diferentes caracóis em cada grupo) foram injetados com L-NAME (1 µg/kg, 10 µg/kg ou 25 µg/kg), SNP (1 µg/kg, 10 µg/kg e 25 µg/kg) ou salina (1mL) e receberam estímulo térmico a 50 °C após 15 min do tratamento. A Tabela 1 mostra os grupos utilizados nesta primeira fase do experimento e seus respectivos tratamentos:

Tabela 1- Grupos utilizados para determinar as doses de L-NAME e SNP a ser utilizada nos experimentos seguintes. As injeções foram realizadas 15 min antes dos animais serem submetidos ao estímulo aversivo (térmico ou químico). Para cada grupo n=10, com diferentes animais em cada grupo.

Grupos	Descrição do tratamento
Controle	Sem nenhum tratamento anterior ao estímulo
Salina	Salina para a espécie (5g/L NaCl, 0.08g/L KCl, 0.06g/LCaCl ₂) (injetado 1mL em cada animal)
L-NAME (1µg/kg) L-NAME (10µg/kg) L-NAME (25µg/Kg)	100 mg L-NAME (Sigma; USA) diluído em 20 mL salina para a espécie (e então dissolvida para a concentração desejada de modo que cada animal recebesse ≈1mL da solução)
SNP (1µg/kg) SNP (10µg/kg) SNP (25 µg/kg)	100 mg SNP (Sigma; USA) diluído em 20 mL salina para a espécie (e então dissolvida para a concentração desejada de modo que cada animal recebesse ≈1mL da solução)

L-NAME e SNP na dose de 25 µg/kg foram escolhidos para os testes seguintes por promoverem valores significativos de latência, sendo medidas como descritas anteriormente.

Na segunda fase foram testados os efeitos do L-NAME e do SNP na nocicepção induzida por estímulos térmico (placa quente a 50 °C) ou químico (capsaina 0,5%) em animais adultos, comparando estes resultados com a antinocicepção induzida por morfina e testando os efeitos do L-NAME e do SNP nesta antinocicepção. Os grupos utilizados nesta segunda fase são mostrados na Tabela 2.

Os tratamentos (controle, salina, L-NAME e SNP) aos quais os animais foram submetidos correspondem aos já definidos na primeira fase do experimento, com as doses e diluições de drogas já descritas anteriormente.

Para o grupo tratado com morfina, os animais foram injetados com sulfato de morfina (Cristália do Brasil S/A, São Paulo, SP, Brasil), na dose de 20 mg/kg de peso corporal.

Tabela 2- Tratamentos aos quais foram submetidos os grupos de animais adultos e o estímulo que receberam (15 min após a injeção). Quando os animais receberam mais de uma droga, a sequência apresentada na tabela é fiel à sequência injetada, respeitando um intervalo de 5 min entre uma injeção e outra. Neste caso, o estímulo aversivo foi aplicado 15 min após a última injeção. Para cada grupo n=20, com diferentes animais em cada grupo.

Animais	Grupos	Estímulo
Adultos	Controle	Placa quente
	Salina	
	Morfina (20 mg/kg)	
	L-NAME (25 µg/kg)	
	SNP (25 µg/kg)	
	Morfina (20 mg/kg)+ L-NAME (25 µg/kg)	
	Morfina (20 mg/kg)+ SNP (25µg/kg)	
	Morfina (20 mg/kg)+ SNP (25 µg/kg) + L-NAME (25 µg/kg)	
	Controle	Capsaicina
	Salina	
	Morfina (20 mg/kg)	
	L-NAME (25 µg/kg)	
	SNP (25 µg/kg)	
	Morfina (20 mg/kg)+ L-NAME (25 µg/kg)	
Morfina (20 mg/kg)+ SNP (25 µg/kg)		
Morfina (20 mg/kg)+ SNP (25 µg/kg) + L-NAME (25 µg/kg)		

3.3.5. Análise Estatística

Para todos os grupos, os dados (média \pm desvio padrão) foram estatisticamente comparados através da análise da variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância foi estabelecido a $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 - ARTIGO I

**Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of young
and adult land snails *Megalobulimus abbreviatus***

Tissue and Cell, submetido em 05.10.2009

Elsevier Editorial System(tm) for Tissue and Cell
Manuscript Draft

Manuscript Number: TISSUEANDCELL-D-09-00111

Title: Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of young and adult land snails *Megalobulimus abbreviatus*

Article Type: Full Length Article

Keywords: central nervous system; land snail; NADPH-d histochemistry; nitric oxide; nitric oxide synthase; ontogenetic variations

Corresponding Author: Dr. Matilde Achaval,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Paula Rigon

Order of Authors: Paula Rigon; Juliana de Castilhos; Cynthia G Molina; Denise M Zancan; Matilde Achaval

Abstract: Nitric oxide (NO) is a gas produced through the action of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and acts as a neurotransmitter in the nervous system of adult gastropod mollusks. There appears to be no information on the presence of NOS-containing neurons in adult and young *Megalobulimus abbreviatus*. Accordingly, we used NADPH-d histochemistry to map the nitrergic distribution in the central nervous systems (CNS) of young and adult animals. The reaction was observed in neurons and fibers in all CNS ganglia of both young and adult snails (pedal, right pleural, left pleural, right parietal, left parietal, visceral, cerebral and buccal), and was particularly strong in the pedal and cerebral ganglia where positive neurons were found clustered symmetrically in the paired ganglia. NADPH-d activity changed in some areas from young to adult animals. Our results provide evidence for the existence of a nitrergic signaling system in young and adult *M. abbreviatus* where NOS was found in specific regions of the CNS.

Distribution of NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of young and adult land snails *Megalobulimus abbreviatus*

P. Rigon^{1,2}, J. de Castilhos², C. G. Molina², D. M. Zancan^{1,3} and M. Achaval^{1,2*}

¹Programa de Pós-Graduação em Neurociências Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Morfológicas, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

³Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (UFRGS), Rua Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Running Title: NADPH-d in the CNS of *M. abbreviatus*.

Keywords: central nervous system, land snail, NADPH-d histochemistry, nitric oxide, nitric oxide synthase, ontogenetic variations.

Acknowledgements: This research was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We are grateful to Antonio G. Severino for his technical assistance. M. Achaval is a CNPq investigator.

***Corresponding author:** Matilde Achaval, Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Phone (Fax): 55 51 33163146. E-mail: achaval@ufrgs.br.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a gas produced through the action of the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and acts as a neurotransmitter in the nervous system of adult gastropod mollusks. There appears to be no information on the presence of NOS-containing neurons in adult and young *Megalobulimus abbreviatus*. Accordingly, we used NADPH-d histochemistry to map the nitrenergic distribution in the central nervous systems (CNS) of young and adult animals. The reaction was observed in neurons and fibers in all CNS ganglia of both young and adult snails (pedal, right pleural, left pleural, right parietal, left parietal, visceral, cerebral and buccal), and was particularly strong in the pedal and cerebral ganglia where positive neurons were found clustered symmetrically in the paired ganglia. NADPH-d activity changed in some areas from young to adult animals. Our results provide evidence for the existence of a nitrenergic signaling system in young and adult *M. abbreviatus* where NOS was found in specific regions of the CNS.

INTRODUCTION

Nitric oxide (NO) is a gas that behaves like a free radical, which, among other functions, modulates neurotransmission and is involved in several different behaviors in vertebrates and invertebrates (Moroz et al., 1993; Gelperin 1994; Vincent, 1994; Elphick et al., 1995; Garthwaite and Boulton, 1995; Teyke, 1996).

NO has the capacity to diffuse through membranes, which enables it to rapidly move in all directions from the site of its synthesis (Xie et al., 2002). The quantity of NO produced depends on nitric oxide synthase (NOS; EC 1.14.23.39). Given that NO cannot be stored in neurons, regulation of this enzymatic activity is of crucial importance. In the presence of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), NOS catalyzes the reaction from L-arginine to L-citrulline and NO (Vincent, 1994). Two classes of NOS have been identified: calcium/calmodulin- dependent constitutive NOS (c-NOS) and calcium-independent inducible NOS (iNOS; Moncada et al., 1991). Additionally, two cNOS isoforms have been described; endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS). The nNOS activity also depends on other co-factors such as flavin mononucleotide, flavine adenine dinucleotide, heme and tetrahydrobiopterine (Bredt and Snyder, 1994; Vincent, 1994).

Studies have provided evidence to show that NOS is expressed in vertebrate and invertebrate nervous systems, thus indicating that the NO signaling pathway is phylogenetically extensive and preserved throughout evolution (Di Cosmo et al., 2000; Palumbo, 2005). The histochemical procedure for detecting NADPH-d and/or immunohistochemical detection of the distribution of NOS has been used in different species of invertebrates, including various gastropod mollusks. Furthermore, there is physiological evidence that NO is involved in many regulatory functions in mollusks:

olfactory modulation (*Limax maximus*, Gelperin, 1994), feeding behavior (*Lymnaea stagnalis*, Moroz et al., 1993; Kobayashi et al., 2000), the release of neurotransmitters (*Aplysia*, Meulemans et al., 1995; *Helix lucorum*, D'yakonova, 2002), nociception inhibition (*Cepaea nemoralis*, Kavaliers et al., 1998), immunocyte activity (*Mytilus edulis*, Steffano and Ottaviani, 2002), associative conditioning and memory (*Helix pomatia*, Teyke, 1996; *Aplysia*, Katzoff et al., 2002), withdrawal behavior (*Helix lucorum*, Malyshev and Balaban, 1999) and the ink defense system of *Sepia* (Di Cosmo et al., 2000; Palumbo, 2005).

In contrast to vertebrates, in invertebrates such as *Helix aspersa*, NOS neuronal distribution has been found to differ from that of neurons with NADPH-d activity (Cooke et al., 1994). The ganglia contained more NADPH-d positive cells than NOS immunoreactive cells (Moroz et al., 1994; Cooke et al., 1994). Nevertheless, 60% co-localization of nNOS and NADPH-d has been found in different pulmonate gastropods (Huang et al., 1997; Peruzzi et al., 2004). In addition, iNOS showed an 80% overlap with NADPH-d following stimulation with different activators (ATP, lipopolysaccharides, Peruzzi et al., 2004). The fact that the histochemical procedure revealed different NADPH-dependent enzymes could explain the difference in co-localization between the two NOS isoforms (Peruzzi et al., 2004; Beesley, 1995). Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH-d) is considered to be equivalent to nitric oxide synthase (NOS), which is the enzyme responsible for nitric oxide (NO) synthesis (Hope et al., 1991). Hence, the simple histochemical method for NADPH-d detection has been used to investigate the distribution of neurons containing NOS activity.

While it is clear that NO is necessary for the normal functioning of adult neural circuitry, little is known about its activity during molluscan development. With the purpose

of furthering characterization of the neurons in the CNS of *Megalobulimus abbreviatus* and in the knowledge that NO and its synthesis enzyme, NOS, are expressed very early in the phylogenetic record, the expression and distribution of nitric oxide were analyzed using the NADPH diaphorase histochemical procedure.

The activity of NOS or NADPH-d varies in the nervous system, according to the ontogenetic developmental stage, as has been described in some aquatic molluscan gastropods (*Ilyanassa*, Lin and Leise, 1996; *L. stagnalis*, Serfösö and Elekes, 2002). In order to identify putative NO-producing neurons in a land snail and describe possible ontogenetic variations, the present study analyzes the NADPH-d histochemistry in the central nervous system of *Megalobulimus abbreviatus* at different ages.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Young and adult *Megalobulimus abbreviatus* snails (n=6 in each group) collected from the county of Charqueadas, RS, were kept in screened terrariums with a 12 h light/dark cycle, controlled temperature (20-25 °C), with lettuce and water *ad libitum*. The experiments were performed in the month of June (Winter) and the animal were sacrificed at the same mid-period (14-16h).

The adult animals were identified by the presence of a pink coloring around the edge of the shell, an average shell length of 7.5 ± 0.5 cm and width of 4.0 ± 0.2 cm, and a weight from 61 to 78 g. The young animals had no pink coloring around the edge of the shell, the average length was 4.0 ± 0.2 cm and width 2.9 ± 0.3 cm, and the weight was 12 to 24 g. All animal procedures were in accordance with the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the local authorities.

Histochemical Procedure

In order to visualize the neurons that produce nitric oxide, the NADPH-diaphorase histochemical technique was used. In this technique NADPH (Sigma, USA) is employed as a substrate and nitro blue tetrazolium (NBT; Sigma, USA) as chromogen, thus producing an insoluble dark blue precipitate, known as formazan (Hope and Vincent, 1989).

The animals were anesthetized in a menthol solution saturated in snail saline for 30 min (Zancan et al., 1997). Immediately after removal from the shell and sectioning of the mantle, the various ganglia of the CNS were removed and fixed in 4% paraformaldehyde diluted in phosphate buffer (PB) 0.1M, pH 7.4, for 4 h at room temperature. They were then cryoprotected in 30% sucrose in PB at 4 °C until they sank. The ganglia were placed in Tissue Tek (Sakura, USA) and frozen in liquid nitrogen cooled isopentane (Vetec, Brasil) and sectioned (50 µm) using a cryostat (Leitz, Germany). The slices were then preincubated in a solution containing 12 µL of Triton X-100 (Sigma) diluted in 100 mL of PB at room temperature for 5 min. After, the slices were incubated in a solution containing 5 mg of NADPH (Sigma) and 3 mg of NBT (Sigma), diluted in PB for 1h and 30 min at 37 °C. They were then washed in PB, mounted on gelatinized slides, dehydrated in an ascending series of alcohol, cleared in xylol and covered with Permount and coverlips. The control technique was carried out by incubating some sections without substrate.

RESULTS

NADPH-d positive neurons and fibers (in form of a blue formazan precipitate) were detected in the CNS ganglia of both young and adult snails (pedal, right pleural, left pleural, right parietal, left parietal, visceral, cerebral and buccal). Paired ganglia usually showed

symmetrical locations of positive neurons. The fibers were identified in a complex pattern of processes in the ganglionic neuropile. Moreover, commissures and nerves also displayed activity. The NADPH-d staining was more intense in the neuropile, commissures and nerves than in the neurons. NADPH-d activity was detected in the neuronal soma, in some nuclei and processes. Staining was also present surrounding neuronal somata, presumably due to the presence of nitroergic glial cells. When the substrate was omitted from the incubation medium, no activity was detected. The number of NADPH-d neuronal bodies was variable from animal to animal. More neuronal enzymatic activity was observed in the pedal and cerebral ganglia than in the other ganglia of the CNS of the *M. abbreviatus*.

In the cortical region of all ganglia, NADPH-d activity was also detected in small glial cell bodies (6-12 μm in diameter) and their processes (5 μm in diameter), which formed the glial lacunar network and the perineural glial cells. These cells were wrapped around the neuronal cell body in several overlapping layers, and three or four processes originated from the glial cell bodies, branched and then extended for several micrometers, surrounding the neuronal bodies. When the neurons were large or giant, glial-positive terminal processes invaginated the neuronal bodies, forming the trophospongium.

In *M. abbreviatus*, the ganglionic neurons were categorized by soma size, according to reviews from Bullock and Horridge (1965), Dorsett (1986), Chase (2002) and Zancan and cols (1997). Small neurons (<20 μm), medium neurons (21-50 μm), large neurons (51-110 μm) and giant neurons (>110 μm) were defined for this pulmonate snail.

NADPH-d reaction product was scattered throughout the ganglionic neuropile of both young and adult animals. Neuropile NADPH-d activity was found in the fine fibers with varicosities (3-4 μm in diameter) and dense clusters of neuronal and glial processes

(Figs.1D, 4C, 4D, 5F, 6B, 6C). NADPH-d positive processes showed a parallel arrangement in commissures, connectives and nerves.

In the mesocerebrum of the cerebral ganglia, dorsal to and at level of the commissure, a group of medium-sized neurons (23-47 μm in diameter) were seen in both adult and young animals (Figs. 1E, 2F). Exclusively in the young animals, a pair of giant neurons (190 μm in diameter) also displayed positive activity (Fig. 2F). Positive fibers appeared in the cerebral commissure, with the most reactive fibers being located in the posterior band that extended through the region.

In dorsal sections to the cerebral commissure, the metacerebral pleural lobe of both young and adult snails showed positive medium-sized neurons (26-39 μm in diameter). Though in young animals, a pair of large neurons (80 μm in diameter) was seen to have enzymatic activity in this region (Fig. 2E).

In the metacerebral pedal lobe from young animals, dorsal to and at the level of the commissure, a group of small-sized neurons (7-18 μm in diameter), medium-sized neurons (21-46 μm in diameter) (Fig. 2D) and one large neuron (53 μm in diameter) were identified. However, the large neuron was not found in adult animals. In the procerebrum from both young and adults animals, innumerable positive fibers were seen between the negative neuronal bodies.

The neuropile of the cerebral ganglia exhibited a dense network of NADPH-d reactive fibers in some areas, and a looser network in others. The neuropilar area, medially to procerebrum (medullar mass) displayed scanty staining. In the antero-lateral and postero-lateral regions of the cerebral commissure, the intensity of the reaction was stronger (Fig. 1A). The cerebral-buccal, cerebral-pleural and cerebral-pedal connectives showed a similar

enzymatic distribution pattern in both young and adult animals, with dense clusters of processes strongly stained and arranged in a parallel form.

NADPH-d positive fine fibers (3 μm in diameter) were also found inside the dorsal body gland located above the esophagus of both young and adult snails.

In the pedal ganglia, in dorsal, medial and ventral sections, positive neurons were seen in the anterior, medial, lateral and posterior regions, in both young and adult animals. Most of the stained neurons were found in the anterior, posterior and medial regions of the medial and ventral sections (Figs. 3, 5). In the anterior region of the ganglia, in medial level sections, a pair of large positive neurons (108 μm in diameter) was found in adult animals (Fig. 3L), while two pairs of large positive neurons (89 and 100 μm in diameter) were found in young animals (Fig. 5H). Besides these cells, a group of medium-sized neurons (20-25 μm in diameter) and another group of small neurons (13-19 μm in diameter) also exhibited enzymatic activity in both young and adult animals (Figs. 3L, 5H).

In young animals, lateral medium-sized neurons (25-32 μm in diameter) were identified as NADPH-d positive in medial sections of pedal ganglia together with a large neuron (82 μm in diameter). In adult animals, the lateral labeling was very similar (Fig. 3M), though with small positive neurons (9-14 μm in diameter).

In the posterior region of ganglia from both young and adult animals, some pairs of large positive neurons (105-108 μm in diameter) were situated in medial sections (Figs. 3K, 5J), while a cluster of medium-sized neurons (40-45 μm in diameter) and small-sized neurons (14 μm in diameter) were located nearer the neuropile (Fig. 5I). Besides these neurons, a pair of giant positive neurons (158 μm in diameter) was also found. In ventral sections of the ganglia from adult snails, but not in young animals, a cluster of medium-

sized neurons (22-42 μm in diameter), nearer to the neuropile, displayed a nuclear enzymatic activity (Figs. 3F, 3G). In the medial region of the ganglia from both young and adult animals, 3 pairs of giant positive neurons (133-156 μm in diameter) were also visualized, together with a cluster of medium-sized neurons (39-41 μm in diameter) (Figs. 3I, 3J, 5G).

The neuropile of the pedal ganglia and their nerve trunks exhibited intense activity in both young and adult animals. NADPH-d fibers were also identified in both pedal commissures (ventral and principal) (Figs. 3H, 3I). These positive fibers exhibited moderate to strong activity, and were arranged in a linear, parallel form in the nerves and commissures. In *M. abbreviatus*, differential labeling of the neuropile has been reported using 5HT-immunoreactivity (Swarowsky et al., 2005). The same differentiation was detected in both groups of animals using NADPH-d histochemistry in sections from the medial, dorsal and ventral regions (Fig. 5F). A larger amount of reactive fibers was found in the medial neuropile area (neuropile area 1) than in the lateral neuropile (neuropile area 2).

In cortical region of the pleural ganglia from adult animals, positive small (15-18 μm in diameter) and medium-sized NADPH-d neurons (24-40 μm in diameter) were found. These neurons exhibited cytoplasmic and nuclear reactivity (Figs. 4C, 4D). The reactive fibers projected from the neuropile of the pleural ganglia towards the right and left parietal ganglia. The neuropile of the pleural ganglia displayed a single staining pattern, with the fibers arranged in a linear form (Fig. 4C). The same fiber distribution pattern was seen in the ganglia of the young animals, though no positive neurons were detected.

In the right parietal ganglion, NADPH-d neurons were detected, with the highest concentration in the posterior region to the neuropile, close to the border with the visceral ganglion. These neurons (medium – 22-50 μm , large – 53-97 μm and giant – 135-157 μm in diameters) were located in the ventral-medial and medial planes of the ganglion (Fig. 4E, 5K). In this region, there were more large neurons stained in young animals than in the adults. The neuropile of both the right and left parietal ganglia were intensely stained, as were the nerves that emerged from them. This fiber distribution pattern was similar in both young and adult animals, with some fibers randomly scattered in the inner region of the ganglia between fibers arranged linearly in a parallel form. The latter were also seen extending from the neuropile of the right parietal ganglion towards the visceral ganglion.

In the left parietal ganglion of young animals a single reactive medium-sized neuron (46 μm in diameter) was detected, while in adult animals, only two neurons (medium – 60 μm in diameter and large – 111 μm in diameter) were found. Furthermore, in the ganglion of young animals, NADPH-d glial cells were seen to form the trophospongium around a giant negative neuron (300 μm in diameter) (Fig. 5L). However, in adult snails, no positive trophospongium was detected.

In the visceral ganglion, a cluster of positive neurons was located in the region posterior to the neuropile. The distribution pattern of these neurons, as well as their size (medium – 20-46 μm in diameter, large – 76-101 μm in diameter and giant – 113-190 μm in diameter) was similar in both young and adult animals, though the number of giant positive neurons detected in the visceral ganglion of young animals was greater than in adult snails (Figs. 4F, 5M). The medium-sized neurons were scattered in the ganglionic

cortex, while the large and giant neurons predominated near to the posterior limit of the ganglion.

In coronal sections of buccal ganglia, positive neuronal clusters were identified in both young and adult snails. Beneath the lateral extension of the neuropile, small positive neuronal groups (17-19 μm in diameter) were detected near the cerebral-buccal connective emergence as in the initial portion of the buccal commissure. In the same region, but near the ganglionic external rim, NADPH-d large (65-103 μm in diameter) and some giant neurons (117-119 μm in diameter) were also found. Even, in the dorsal portion of the ganglia, near the buccal commissure, positive medium-sized neurons (22-50 μm in diameter) were distinguished. Neuropile, nerves and the buccal commissure exhibited an intense NADPH-d activity, with fibers scattered throughout the inner region of the neuropile and in a linear parallel form in the commissure and nerves. This distribution of positive neurons and fibers was similar in both young and adult snails (Fig. 6).

DISCUSSION

Our histochemical study demonstrated the presence of neuronal populations which stained positively for NADPH-diaphorase, a marker for NOS, in the ganglia of the CNS of both young and adults *M. abbreviatus*. Nevertheless, in the same region some cells have not enzymatic activity. In each ganglion, several differently sized neurons were stained with NADPH-d. Among the positive neurons the intensity of the staining varied, perhaps due to different amounts of intracellular NOS (Meulemans et al., 1995). Furthermore, nerve fibers in the neuropile, commissures, interganglionic connectives and nerves also displayed enzymatic activity. NADPH-d was located mainly in the neuronal soma and its processes,

but in some neurons within defined clusters the activity was observed in the nuclei. As no staining occurred in the absence of β -NADPH in the incubation medium, we can be assured that the positive histochemical reaction observed in some neurons is β -NADPH-dependent. In the present study, we cannot explain the nuclear presence of NOS, and more investigation is necessary to verify this fact.

The intense staining observed in connectives and nerves suggests the presence of the nitrergic system in the peripheral nervous system (PNS) of both young and adult *M. abbreviatus*, but the object of our study was the CNS and not the PNS.

NADPH-d activity has been demonstrated in representative groups of gastropod land pulmonate (Huang et al., 1997; Cooke et al., 1994) and marine opisthobranchs (Moroz et al., 1996). In *Lymnaea*, the majority of putative nitrergic neuronal somata were found in the buccal ganglia (Moroz et al., 1994), in the esophagus (Moroz et al., 1993) and in the lips (Elphick et al., 1995). In buccal ganglia of *Helix* a similar distribution has been observed (Cooke et al., 1994; Huang et al., 1997). In *Pleurobranchaea californica*, intense NADPH-d central motoneuron labeling was observed, mainly in the pedal ganglia, though many positive somata were also found in the buccal ganglia (Moroz and Gillette, 1996). The mollusk *Clione limacina* has relatively few NADPH-d positive neurons in its CNS, which are located mainly in the cerebral ganglia (Moroz et al., 2000). In contrast, in the CNS of *M. abbreviatus*, all ganglia in adult animals and most ganglia in the young animals displayed NADPH-d neurons and neuropiles.

Potential sources of NO in the CNS of *M. abbreviatus* include specific groups of NADPH-d neurons located mainly in the cerebral and pedal ganglia. NADPH-d reactive

neuropilar processes were observed in nearly all central ganglia, suggesting a possible widespread action of NO within different areas of the CNS.

In the cerebral ganglia of both young and adult animals, the stained neurons were detected mainly in mesocerebrum and metacerebrum. In mesocerebrum, the location of positive neurons is similar to that observed in *Helix aspersa* (Sánchez-Alvarez et al., 1994) and *Helix pomatia* (Huang et al., 1997), and it is possible to suggest a certain homology between the medium-sized neurons found in this same region of these mollusks. These neurons, in other species of gastropods, are involved in feeding and reproductive behaviors (Chase, 2000). The pair of giant cerebral neurons in mesocerebrum, detected in young animals, is known to be serotonergic in this species (Zancan et al., 1997), and this evidence together with their morphological features and similar location in other gastropod species suggest a role for these neurons in the higher modulation of feeding behavior (Dorsett, 1986). In species such as *Lymnaea stagnalis* and *Helix pomatia* the NO is also involved in this function (Moroz, 2000; Serfözö et al., 2008).

The positive neurons found in pleural and pedal lobes of metacerebrum in both young and adult *M. abbreviatus* are similar to those NADPH-d neurons identified in pedal and pleural lobes of metacerebrum in *H. pomatia* (Huang et al., 1997). Unlike the mesocerebrum and procerebrum, the metacerebrum has no single, or easily characterized, function (Chase, 2000).

The neuropile of cerebral ganglia in *M. abbreviatus*, like the cerebral nerves, show strong staining similar to that of *Helix pomatia* (Huang et al., 1997) and *Clione limacine* (Moroz et al., 2000). In *Helix pomatia* the lip nerves and tentacle nerves also contained numerous NADPH- positive nerve fibers, which entered the neuropile of the cerebral

ganglia (Huang et al., 1997). These data suggest involvement of NO in processing sensorial mechanisms that occur in the cerebral ganglia in both young and adult *M. abbreviatus*.

In contrast to the large population of small positive neurons in the lateral part of procerebrum in *H. aspersa* (Sánchez-Alvarez et al., 1994) and in *H. pomatia* (Huang et al., 1997), in young and adult *M. abbreviatus* is not distinguished positive neurons. It is well known that in some gastropods, the procerebrum is involved in the integration of olfactory information (Chase, 2002). As *M. abbreviatus* procerebrum does not revealed any positive neurons, this probably suggest that the neurons involved in the olfactory circuit could be located in other region of the cerebral ganglia or in some peripheral tissue.

In the pedal ganglia both young and adult *M. abbreviatus* the different regions contained positive neurons and neuropile. Small, medium, large and giant neurons show enzymatic activity, in contrast to *Helix pomatia* (Huang et al., 1997) and *Clione limacine* (Moroz et al., 2000) that display few NADPH-d neurons. Besides other neurons, a pair of giant NADPH-d neurons was observed in the medial region of the pedal ganglia. These NADPH-d neurons also have the same location as the giant 5-HT neuron in *M. abbreviatus* (Swarowsky et al., 2005) and probably correspond to the Pd4 neuron in *H. lucorum* (Balaban et al., 2001), which was shown to be involved in motor behavior and modulation of withdrawal behavior. It is also possible to suggest a certain homology between the anterior NADPH-d positive neurons of the pedal ganglia and some serotonergic neurons described in *M. abbreviatus* as being involved in the withdrawal response and elicited facilitation of the withdrawal behavior (Swarowsky et al., 2005).

In order to understand the involvement of the lateral and posterior clusters of NADPH-d positive neurons found in the pedal ganglia of *M. abbreviatus* further investigation is necessary.

The fact that, in the neuropile of the pedal ganglia the different markers (NADPH-d, 5-HT) identified the same distribution pattern (NP1 and NP2) is quite significant. The NP1 is located adjacent to the anterior NADPH-d positive neurons, extending until the point where the anterior pedal nerves emerge. Thus, this may represent an area of anterior pedal nerve synaptic connections and/or projections originating from the foot. We cannot exclude the possibility that this neuropilar area receives axons from neuronal somata located in other ganglionic regions and may thus constitute an important area for the integration of the motor circuit proposed by Swarowsky and cols. (2005). Using retrograde labeling procedure in *M. abbreviatus*, Malysz (2002) identified axons that originate from the pedal musculature, penetrate the ipsilateral pedal ganglion, are distributed within the NP1 and project through the pedal-cerebral connective to the cerebral ganglion. In addition, positive fibers extend from NP1 through the pedal-pleural connective to the ipsilateral pleural ganglion and through the pedal commissures to the contralateral pedal ganglion. Given the fact that the NP1 has characteristics of an area of synaptic integration of 5-HT neurons and as it is made up of interganglionic projective fibers, it could be proposed as a possible integrative area of the aversive behavior neural circuit (Swarowsky et al., 2005). This hypothesis is supported by the possible homology existing between the 5HT-ir elements of *M. abbreviatus* and the circuit described in *H. lucorum* (Balaban, 2002). The NP2, in *M. abbreviatus* may be involved in other functions and not directly in the modulation of withdrawal behavior (Swarowsky et al., 2005). Thus, the distribution of NADPH-d positive fibers was found in both young and adult a *M. abbreviatus*, which suggests that NO is involved in motor behavior. Recently, it has been recognized that there is significant morphological and functional overlap between 5-HT and NO. This has prompted the suggestion that NO can modulate presynaptic 5-HT release (Straub et al., 2007).

As in adult *Clione limacine* (Moroz et al., 2000), no labeled neuronal somata were detected in the pleural ganglia of young *M. abbreviatus*. However, in medial and lateral regions of the pleural ganglia of adult animals, positive small- and medium-sized NADPH-d neurons were found. These cells could be homologous to the clusters of small-sized and medium-sized neurons intensely stained in the left and right pleural ganglia, near to their neuropile, in *Helix pomatia* (Huang et al., 1997).

NO is an important signaling molecule in the feeding system of *Helix*, partially involved in cooperation with different molluscan neuropeptides in the regulation of both neuronal and muscular activities (Serfözö et al., 2008). In *Helix lucorum*, an anatomical relationship and functional interaction of NO liberating nerve cells and FMRFamide were observed, suggesting a regulatory role of FMRFamide in the NO signaling mediated in the CNS of invertebrates (Röszer et al., 2004). In the pleural ganglia of *M. abbreviatus*, the similar distribution of NADPH-d neurons with FMRFamide neurons suggests that regulation might exist.

In different adult gastropods, the giant neuron of the mesocerebrum is NADPH-d reactive, however this is not observed in adult *M. abbreviatus*. Furthermore, this neuron is positive in young *M. abbreviatus*. Therefore in young *M. abbreviatus* the mesocerebral giant neuron may be involved in the feeding control as in other gastropods. As in adult *M. abbreviatus* this neuronal activity recedes, its function may be replaced by the pleural NADPH-d neurons, only observed in adult animals.

The parietal and visceral ganglia are involved in regulation of the internal environment in gastropods, controlling the respiratory function and hemolymph circulation (Chase, 2002). In the right parietal ganglia of both young and adult *M. abbreviatus* medium-, large-sized and giant NADPH-d neurons were detected mainly in the region

posterior to the neuropile, close to the border with the visceral ganglion. In others mollusks, only small- and medium-sized neurons have been described (Sánchez-Alvarez et al., 1994; Huang et al., 1997). In the left parietal ganglion of both young and adult animals a few neurons were detected. In the visceral ganglion, a cluster of positive neurons were located in the region posterior to the neuropile, and the distribution pattern of these neurons, as well as their size was similar in both young and adult animals, though the number of giant positive neurons detected in the visceral ganglion of young animals was greater than the adult snails. Based on their location and antidromic responses (Zakharov et al., 1995), we think that these NADPH-d positive neurons are similar to those previously identified as serotonergic in *H. lucorum*, where the left parietal and the visceral ganglia may be involved in controlling the heart and intestinal tract, though their precise function is still unknown (Zakharov et al., 1995). It is important to highlight that the right parietal neurons were commanded by the Pd4 neuron located in the pedal ganglia.

The large and giant positive parietal neurons are found in greater number in young animals. These withdrawal neurons represent the last stage of integration of the sensory information in the molluscan CNS before motor programming begins (Balaban, 2002). These data reinforce the idea that the NO is involved in motor behavior.

The NADPH-d positive terminal glial processes invaginated the neuronal body of the giant neuron in the left parietal ganglion, forming the trophospongium, which suggests that NO may mediate neuron-glial communication. In addition, NO is among the substances released by functionally impaired neurons and is known to elicit microglial activation, and microglial cells themselves produce NO in response to cell activation stimuli (Peruzzi et al., 2004). Thus, we have assumed a role for NO in the cross-talk

between neurons and microglia in the CNS of the *M. abbreviatus* during development, because the trophospongium only appears positive in young animals.

The buccal ganglia innervate the pharyngeal wall, muscles, salivary gland, esophagus and stomach. In *M. abbreviatus* these ganglia displayed many NADPH-d neurons, and the enzymatic activity was very intense in the neuropilar fibers, which could proceed from the cerebral ganglia, through to the cerebro-buccal connective. In gastropod mollusks, the synchronous rhythmic movements of buccal mass command the movements of feeding behavior, because the buccal ganglia contain the central pattern generator (CPG) (Yoshida and Kobayashi, 1992).

NO has undoubtedly significant effects on molluscan feeding behavior, and NOS has been shown to be widely distributed throughout the neuronal networks that underlie the control and initiation of feeding behavior in mollusks (Moroz et al., 1993; Moroz et al., 1994; Elphick et al., 1995; Moroz and Gillette, 1995). Whether and in what way these neurons affect the activity of the feeding circuitry is unknown. NADPH-d reaction product in the buccal ganglia of both young and adult *M. abbreviatus* suggests that in these animals the feeding circuitry could also be modulated by NO.

In the developing nervous system, the location of NADPH-d reactivity suggests that NO mainly participates in sensory processes (Serfözö et al., 1998). The present paper is the first to describe and compare putative neurons releasing NO in both young and adult *M. abbreviatus*. Most studies in this area have been performed in embryos and juvenile animals (Cole et al., 2002; Serfözö et al., 1998; Serfözö and Elekes, 2002). The production of NO is a key step for some early phases of neurogenesis, such as neural cell proliferation and migration, and the position of some positive cells in the urodele amphibian *Pleurodeles*

waltl is coincident with that region that is known to be occupied by serotonergic neurons (Moreno et al., 2002).

The decision to study young animals in the present experiment was based on the fact that several studies carried out in other species of mollusks have shown that NOS expression is initiated in the CNS during the developmental stages (Cole et al., 2002; Serfözö et al., 1998; Serfözö and Elekes, 2002). Moreover, it is known that in young snails serotonin also begins to be expressed after hatching, in later developmental phases (Zakharov and Balaban, 1987). During development, NO is also involved in axonal outgrowth and synaptogenesis (Bicker, 2001). It is possible to suggest that in *M. abbreviatus* the NO could perform the aforementioned functions.

In previous experiments with *M. abbreviatus* (Swarowsky et al., 2005), serotonergic neurons from the CNS were shown to be involved in the nociceptive circuit. Further studies are necessary in order to verify the probable interaction between the neuronal groups producing NO and nociceptive circuit in this animal. Thus, considering the involvement of NO in feeding behavior, together with the similarity of the locations of 5-HT neurons involved in the nociceptive circuit in *M. abbreviatus* and the NADPH-d neurons, the existence of an opiate-modulated system that enhances food intake in the stress responses evoked by nociceptive stimuli in *Lymnaea maximus* (Kavaliers and Hirst, 1986), and comparing the location of enzymatic activity showed in previous studies, which display similar distribution patterns for enkephalin, substance P and FMRFamide (neuropeptides involved in nociception; Zancan, 1996; Moriguchi-Jeckel, 2001; Faccioni-Heuser et al., 2004), the next step in our research is to investigate the probable involvement of the nitrenergic system in nociceptive behavior modulation, in an attempt to elucidate its function in this signaling pathway.

REFERENCES

Balaban, P.M., 2002. Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 597-630.

Balaban, P.M., Bavarenko, N.I., Makisimova, O.A., Nikitin, E., Jerusalensky, V.N., Zakharov, I.S., 2001. A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail. *Neurobiol. Learn. Mem.* 75, 30-50.

Beesley, J.E., 1995. Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase. *Histochem. J.* 27, 757-769.

Bicker, G., 2001. Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroide insect. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 48, 100-110.

Bredt, D.S., Snyder, S. H., 1994. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron.* 8, 3-11.

Bullock, T.H., Horridge, G.A., 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates.* San Francisco, Freeman and Co., Vols. 1 and 2.

Chase, R., 2000. Structure and function in the cerebral ganglion. *Microsc. Res. Tech.* 49, 511-520.

Chase, R., 2002. Behavior and its neural control in Gastropod Molluscs. Oxford University Press, USA, 334pp.

Cole, A.G., Mashkournia, A., Parries, S.C., Goldberg, J.I., 2002. Regulation on early embryonic behavior by nitric oxide in the pond snail *Helisoma trivolvis*. J. Exp. Biol. 205, 3143-3152.

Cooke, I.R.C., Edwards, S.L., Anderson, C.R., 1994. The distribution of NADPH diaphorase activity and immunoreactivity to nitric oxide synthase in the nervous system of the pulmonate mollusc *Helix aspersa*. Cell Tissue Res. 277, 565-572.

Di Cosmo, A., Di Cristo, C., Palumbo, A., D'ischia, M., Messenger, J.B., 2000. Nitric oxide synthase (NOS) in the brain of the cephalopod *Sepia officinalis*. J. Comp. Neurol. 428, 411-427.

Dorsett, D.A., 1986. Brain to Cells: The neuroanatomy of selected gastropod species. In Wilbur, K. M. (Ed.): The Mollusca. Academic Press, New York Vol. 9 (Neurobiology and Behavior, Part 2), 101-187.

D'yakonova, T.L., 2002. Interaction between serotonin and nitric oxide (NO) in the activation of the serotonergic system in the common snail. Neurosci. Behav. Physiol. 32, 275-282.

Elphick, M.R., Kemenes, G., Staras, K., O'Shea, M., 1995. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J. Neurosci.* 15, 7653-7664.

Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M., 2004. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1043-1054.

Garthwaite, J., Boulton, C.L., 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.* 57, 683-706.

Gelperin, A., 1994. Nitric oxide mediated network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature.* 369, 61-63.

Hope, B.T., Vincent, S.R., 1989. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 653-661.

Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M., Vincent, S.R., 1991. Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 2811-2814.

Huang, S., Kerschbaum, H., Engel, E., Hermann, A., 1997. Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J. Neurochem.* 69, 2516-2528.

Kavaliers, M., Hirst, M., 1986. Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the slug *Limax maximus*. *Life Sci.* 38, 203-209.

Kavaliers, M., Choleris, E., Prato, F.S., Ossenkopp, K., 1998. Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail. *Brain Res.* 809, 50-57.

Katzoff, A., Ben-Gedalya, T., Susswein, A.J., 2002. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *Aplysia*. *J. Neurosci.* 22, 9581-9594.

Kobayashi, S., Sadamoto, H., Ogawa, H., Kitamura, Y., Oka, K., Tanishita, K., Ito, E., 2000. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci. Res.* 38, 27-34.

Lin, M.F., Leise, E.M., 1996. NADPH-diaphorase activity changes during gangliogenesis and metamorphosis in the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *J. Comp. Neurol.* 374, 194-203.

Malyshev, A., Balaban, P.M., 1999. Synaptic facilitation in *Helix* neurons depends upon postsynaptic calcium and nitric oxide. *Neurosci. Lett.* 261, 65- 68.

Malysz, T., 2002. Distribuição dos nervos dos gânglios pedais e marcação da região posterior do pé do *Megalobulimus oblongus*. Master Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 125p.

Meulemans, A., Mothet, J.P., Schirar, A., Fossier, P., Tauc, L., Baux, G., 1995. A nitric oxide synthase activity is involved in the modulation of acetylcholine release in *Aplysia* ganglion neurons: a histological voltammetric and electrophysiological study. *Neuroscience*. 69, 985-995.

Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.

Moreno, N., López, J.M., Sánchez-Camacho, C., González, A., 2002. Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J. Chem. Neuroanat.* 23, 105-121.

Moriguchi-Jeckel, C.M. 2001. Imunorreatividade a FMRFamida no sistema nervoso central e na musculatura pediosa de *Megalobulimus oblongus*. Master Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90p.

Moroz, L.L., Park, J.H., Winlow, W., 1993. Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport*. 5, 643-646.

Moroz, L.L., Winlow, W., Turner, R.W., Bulloch, A.G.M., Lukowiak, K., Syed N.I., 1994. Nitric oxide synthase immunoreactive cells in CNS and periphery of *Lymnaea*. *Neuroreport*. 5, 1277-1280.

Moroz, L.L., Gillette R., 1995. From Polyplacophora to Cephalopoda: comparative analysis of nitric oxide signaling in mollusca. *Acta Biol. Hung.* 46, 169–182.

Moroz, L.L., Gillette, R., 1996. NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. *J. Comp. Neurol.* 367, 607-622.

Moroz, L.L., Chen, D., Gillette, M., Gillette, R., 1996. Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J. Neurochem.* 66, 873-876.

Moroz, L.L., 2000. Giant identified NO-releasing neurons and comparative histochemistry of putative nitrenergic systems in gastropod molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 49, 557-569.

Moroz, L.L., Norekian, T.P., Pirtle, T.J., Robertson, K.J., Satterlie, R.A., 2000. Distribution of NADPH-diaphorase reactivity and effects of nitric oxide on feeding and locomotory circuitry in the pteropod mollusc, *Clione limacine*. *J. Comp. Neurol.* 427, 274-284.

Palumbo, A., 2005. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 142, 241-248.

Peruzzi, E., Fontana, G., Sonetti, D., 2004. Presence and role of nitric oxide in the central nervous of the freshwater snail *Planorbarius corneus*: possible implication in neuron-microglia communication. *Brain Res.* 1005, 9-20.

Röszer, T., Jenei, Z., Gáll, T., Nagy, O., Czimmerer, Z., Serfözö, Z., Elekes, K., Bánfalvi, G., 2004. A possible stimulatory effect of FMRFamide on neuronal nitric oxide production in the central nervous system of *Helix lucorum* L. *Brain Behav. Evol.* 63, 23-33.

Sanchez-Alvarez, M., León-Olea, M., Talavera, E., Pellicer, F., Sánchez-Islas, E., Matínez-Lorezana, G., 1994. Distribution of NADPH-diaphorase in the periesophageal ganglia of the snail, *Helix aspersa*. *Neurosci. Lett.* 169, 51-55.

Serfösö, Z., Elekes, K., 2002. Nitric oxide level regulates the embryonic development of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: pharmacological, behavioral, and ultrastructural studies. *Cell Tissue Res.* 310, 119-130.

Serfösö, Z., Szentmiklósi, A. J., Elekes, K., 2008. Characterization of nitric oxidergic neurons in the alimentary tract of the snail *Helix pomatia* L.: histochemical and physiological study. *J. Comp. Neurol.* 506, 801-821.

Serfösö, Z., Elekes, K., Varga, V., 1998. NADPH-diaphorase activity in the nervous system of the embryonic and juvenile pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tissue Res.* 292, 579-586.

Stefano, G.B., Ottaviani, E., 2002. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. *Brain Res.* 924, 82-89.

Straub, V.A., Grant, J., O'Shea, M., Benjamin, P.R., 2007. Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. *J. Neurophysiol.* 97, 1088-1099.

Swarowsky, A., Montero, A., 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. A Mol. Integr. Physiol.* 141, 230-238.

Teyke, T., 1996. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia*. *Neurosci. Lett.* 206, 29-32.

Vincent, S.R., 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 42, 129-160.

Xie, M., Hermann, A., Kerschbaum, H.H., 2002. Complementary distribution of NADPH-diaphorase and l-arginine in the snail nervous system. *Cell Tissue Res.* 307, 393-400.

Yoshida, M., Kobayashi, M., 1992. Cerebral and buccal neurons involved in buccal motor pattern generation in *Achatina fulica*. *Acta Biol. Hung.* 43, 361-6.

Zakharov, I.S., Balaban, P.M., 1987. Neural mechanisms of age-dependent changes in avoidance behavior of the snail *Helix lucorum*. *Neuroscience*. 23, 721-729.

Zakharov, I.S., Ierusalimsky, V.N., Balaban, P.M., 1995. Pedal serotonergic neurons modulate the synaptic input of withdrawal interneurons of *Helix*. *Invertebr. 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*. Doctoral Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 238p.

Zancan, D.M., Brauer, M., Achaval, M., 1997. Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 118, 765-772.

LEGENDS

Fig. 1- **A, B and C**- Schematic representation of cerebral ganglia from adult snail *M. abbreviatus* sectioned at different levels, displaying the NADPH-d positive neurons (black circles) and fibers. cc, cerebral commissure; db, dorsal body; mc, mesocerebrum; pmt, pedal lobe of metacerebrum; plmt, pleural lobe of metacerebrum; prc, procerebrum. **D**- Medial view of the cerebral ganglia showing the cerebral commissure (cc), neuropilar areas (NP) with thin fibers and dense clusters (np) of neuronal and glial processes, medullar mass with little staining (asterisk), mesocerebrum (mc), pleural lobe of metacerebrum (plmt). Scale bar: 250 μ m. **E**-Dorsal section of mesocerebrum (mc) showing a cluster of medium neurons (arrows) NADPH-d positives and the dorsal body (db) whit reactivity. Scale bar: 100 μ m.

Fig.2- **A, B and C**- Schematic representation of cerebral ganglia from *M. abbreviatus* young snail sectioned at different levels, displaying the NADPH-d neurons (black circles) and fibers. cc, cerebral commissure; db, dorsal body; mc, mesocerebrum; pmt, pedal lobe of metacerebrum; plmt, pleural lobe of metacebrum; prc, procerebrum. **D**- Medial section of pedal lobe of metacerebrum with medium-sized neurons (arrows) and small-sized neurons (arrowhead) positives. Scale bar: 50 μ m. **E**- Dorsal section of the pleural lobe of metacerebrum showing a large neuron (asterisk) and medium neurons (arrow). Scale bar: 50 μ m. **F**- Dorsal section of mesocerebrum showing a giant neuron (double asterisk) and a cluster of medium neurons (double arrow). Scale bar: 100 μ m.

Fig. 3- **A, B, C, D and E**- Schematic representation of pedal ganglia from adult *M. abbreviatus* sectioned at different levels, displaying the NADPH-d neurons (black circles) and fibers. Black circles: cytoplasmic activity; grey circles: nuclear activity. **F**- Ventral view of the pedal ganglia showing neuronal clusters with enzymatic activity in the cytoplasm (double arrowhead) and in the nuclei (arrow). Scale bar: 100 μm . **G**- Higher magnification showing enzymatic cytoplasmic activity and negative nuclei (black asterisk) and enzymatic nuclear activity (white asterisk). Scale bar: 25 μm . **H**- Section at level of ventral commissure (vc); note a giant medial neuron NADPH-d positive (arrow). Scale bar: 250 μm . **I**-Section at level of major commissure (MC) with giant neurons (arrows) and large neuron (arrowhead) in the medial region. Scale bar: 250 μm . **J**- Giant neuron (double white asterisk) located in the medial region (named Pd4). Scale bar: 100 μm . **K**- In the posterior region of the pedal ganglia note a large neurons (black asterisk) and a giant neuron (white asterisk). Scale bar: 100 μm . **L**- In the anterior region of the pedal ganglia note a large neuron (asterisk) with a cluster of medium-sized neurons (arrow) and small-sized neurons (arrowhead). Scale bar: 100 μm . **M**- In the lateral region of the pedal ganglia note a large neuron (asterisk) with processes (arrow) extending to the neuropile (NP). Scale bar: 50 μm .

Fig. 4- **A and B**- Schematic representation of pleural ganglia (pl), right parietal ganglia (rpa), left parietal ganglia (lpa) and visceral ganglion (v) from adult snail sectioned at different levels, displaying neurons with the NADPH-d cytoplasm (black circles), the positive nuclei NADPH-d (grey circles) and fibers. **C**- Section of pleural ganglia with the neuropilar area (NP) displaying strong activity and small neurons in the cytoplasm (arrow) or in nuclei (arrowhead). Scale bar: 100 μm . **D**- Higher magnification of small-sized

neurons of the pleural ganglia showing the positive nuclear area (asterisk). Scale bar: 10 μm . **E and F**- In the right parietal ganglia (E) and in the visceral ganglion (F) note the different positive giant (double asterisk), large (white asterisk) and medium (double arrow) neurons. Scale bar: 100 μm .

Fig. 5- **A, B, C, D and E**- Schematic representation of the subesophageal complex from young *M. abbreviatus* sectioned at different levels displaying NADPH-d neurons (black circles) and fibers. pe, pedal ganglia; pl, pleural ganglia; rpa, right parietal ganglia; lpa, left parietal ganglia; v, visceral ganglion. **F**- Section of pedal ganglia showing the neuropilar areas (NP1 and NP2), and neurons in anterior (a), medial (m) and posterior (p) regions. Scale bar: 250 μm . **G**- Medial area of the pedal ganglia with higher magnification of the giant Pd4 neuron (asterisk) located. Scale bar: 50 μm . **H**- Anterior region of pedal ganglia with large neurons (white asterisk) and a cluster of medium-sized neurons (mn). Scale bar: 50 μm . **I and J**- Posterior region of pedal ganglia showing small neurons (double arrow), medium neurons (arrowhead) and large positive neurons (white asterisk). Scale bar: 100 μm . **K**- In right parietal ganglia note giant (black asterisk), large (white asterisk) and medium-sized positive neurons (arrowhead). Scale bar: 100 μm . **L**- In left parietal ganglia note giant negative neuron (asterisk) with a trophospongium (arrowhead) positive. Scale bar: 100 μm . **M**- In visceral ganglion note giant (black asterisk), large (white asterisk) and medium-sized NADPH-d neurons (arrows). Scale bar: 100 μm .

Fig 6- **A** – Schematic representation of NADPH-d positive cell bodies and fibers in the buccal ganglia from adult (**B**) and young (**C**) snail. bc, buccal commissure. Scale bar: 500

μm . **B and C**- Sections showing the neuropilar area (NP), large (asterisk) and medium (arrow) neurons located similarly in both snail. Scale bar: 100 μm .

Figure 1

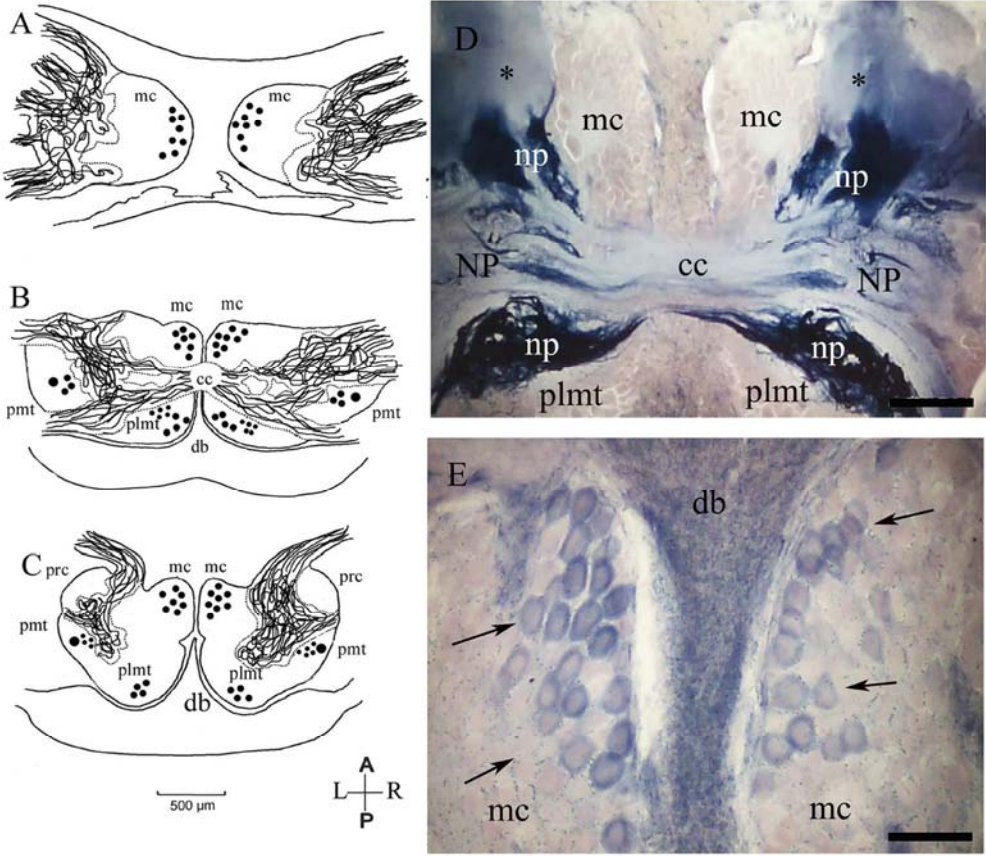


Figure 2

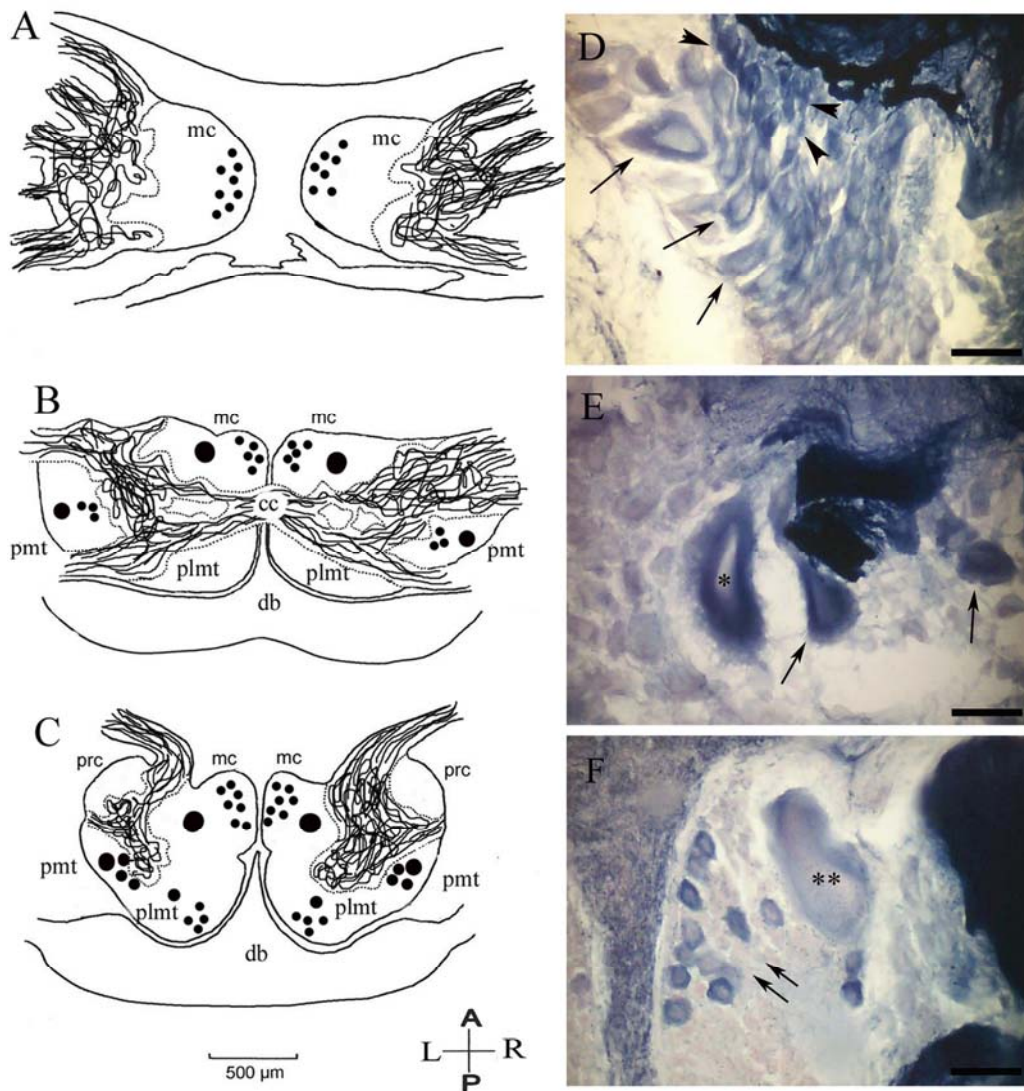


Figure 3

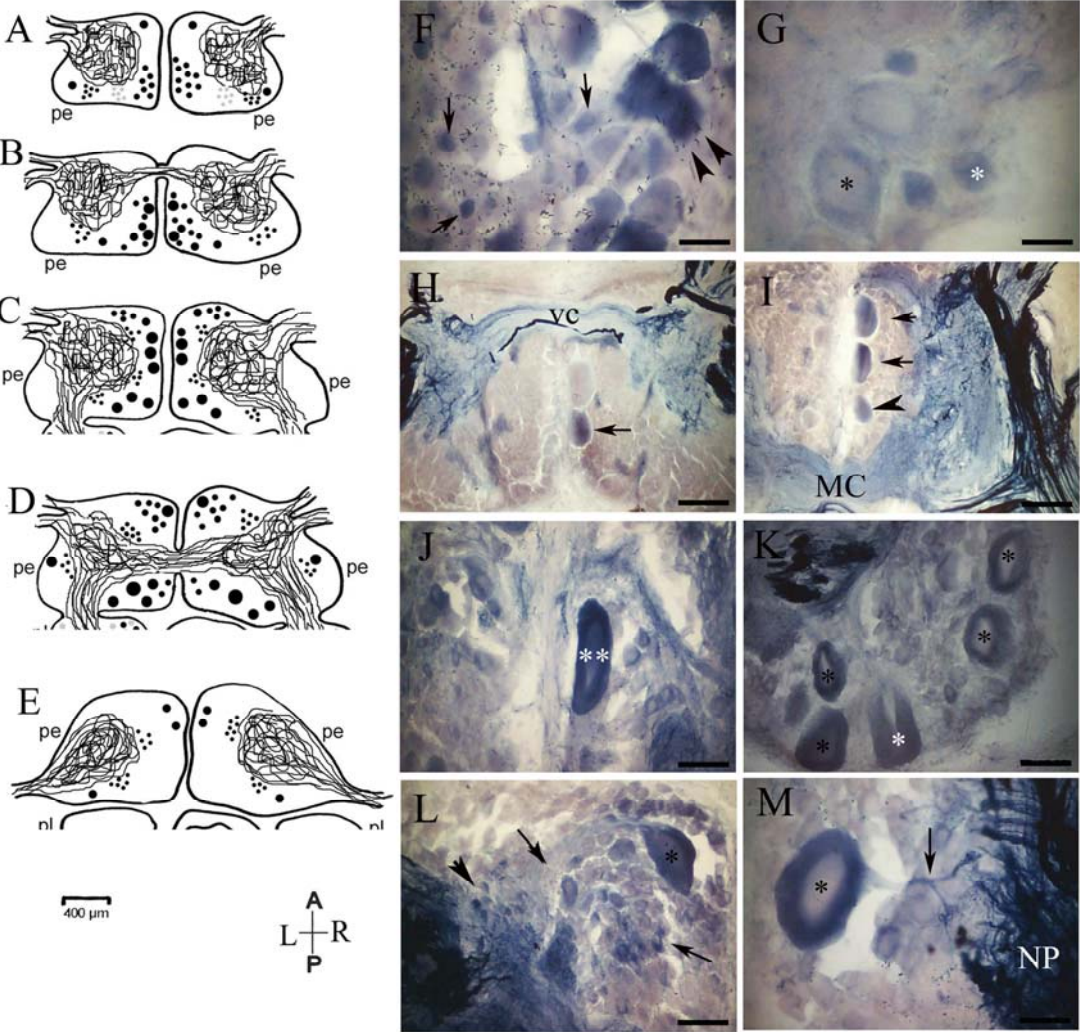


Figure 4

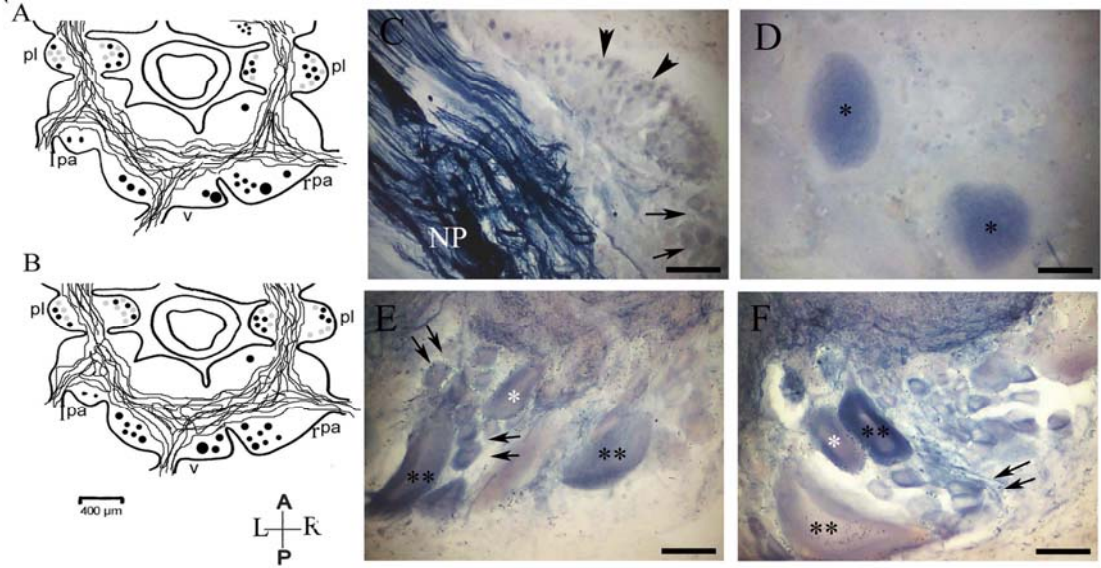


Figure 5

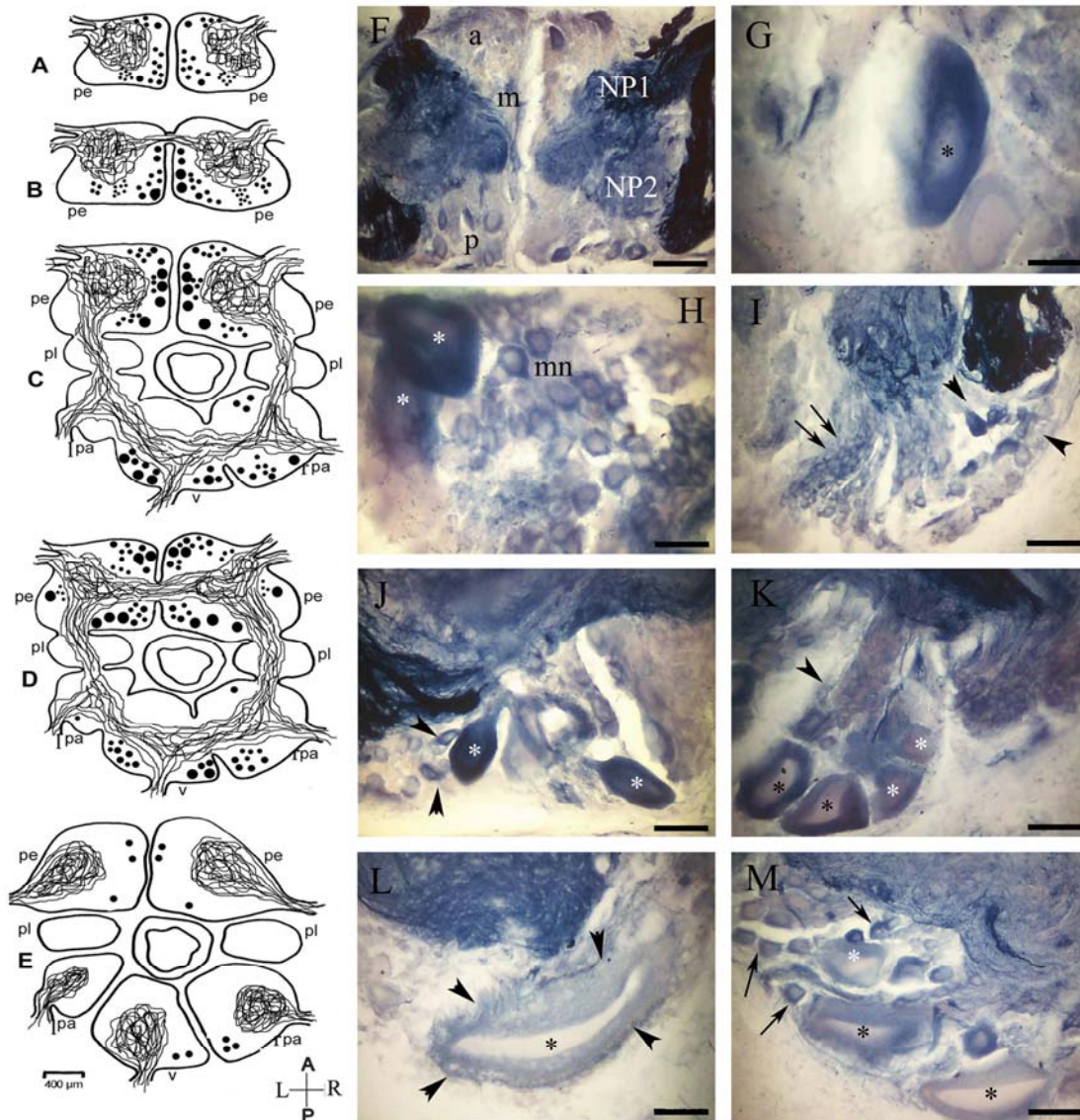
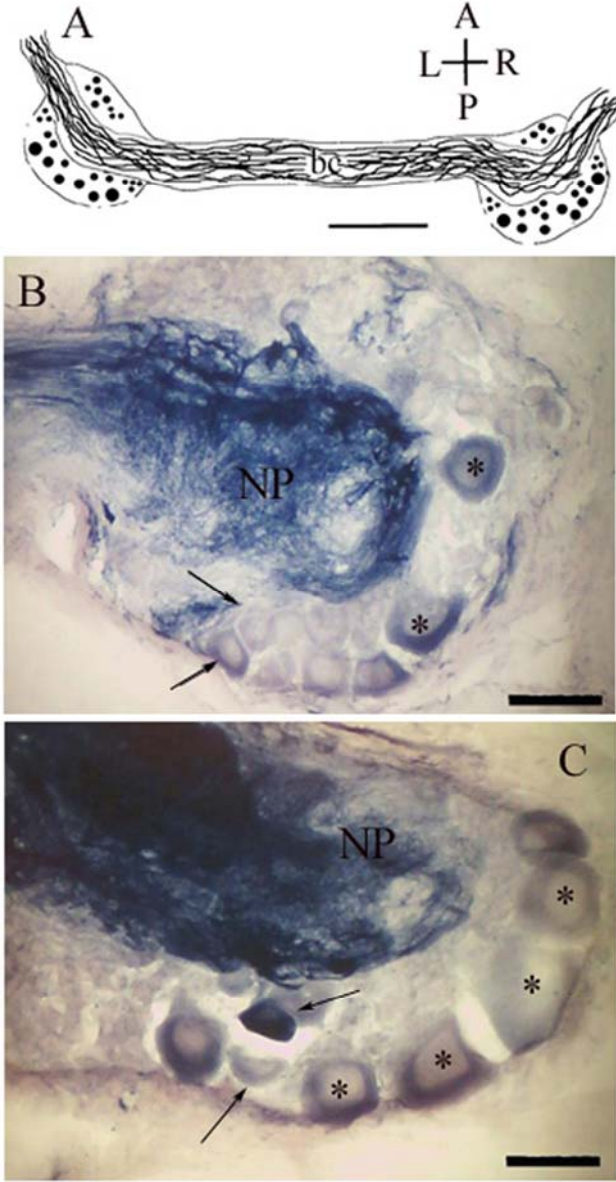


Figure 6



4.2 - ARTIGO II

NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus*

***abbreviatus*: The involvement of pedal ganglia**

Invertebrate Neuroscience, aceito em 01.12.2009

NADPH-diaphorase activity in the nociceptive pathways of land snail *Megalobulimus abbreviatus*: the involvement of pedal ganglia

Paula Rigon · Juliana de Castilhos · Lisiani Saur · Mariana F. Rodrigues ·
 Matilde Achaval · Léder L. Xavier

Received: 21 August 2009 / Accepted: 1 December 2009
 © Springer-Verlag 2009

Abstract NADPH-diaphorase (NADPH-d) is a histochemical marker for nitric oxide synthase (NOS), widely used to identify nitric oxide (NO) producing cells in the nervous system of both vertebrates and invertebrates. Using NADPH-d histochemistry and semi-quantitative optical densitometry, we characterized the NO-producing neurons in the pedal ganglia of young and adult *Megalobulimus abbreviatus*, subjected to aversive thermal stimulus. The animals were killed at different times (3, 6, 12 and 24 h) following stimulus. The enzymatic activity was detected in different cellular subsets and neuronal processes. In all the studied pedal ganglia subregions, the optical density of positive neurons ($P < 0.05$) and neuropilar area I ($P < 0.01$) was significantly different in treated animals when compared to controls. The increase in nitregeric activity induced by nociceptive stimulus suggests the involvement of NO in the nociceptive circuit of *M. abbreviatus*, which is well maintained throughout

evolution, and could be helpful in drawing cellular homologies with other gastropods.

Keywords NADPH-diaphorase · Nitric oxide · Nociception · Optical density · Thermal stimulus

Introduction

Nitric oxide (NO) is an important neuromodulator in the gastropod nervous system and is involved in several different behaviors in vertebrates and invertebrates (Elphick et al. 1995; Garthwaite and Boulton 1995; Teyke 1996; Xie et al. 2002). The role of NO in the adaptive responses of an organism to stress conditions is of special interest. NO production may be altered by a variety of stressors including restraint, immobilization, hypoxia, hypo- and hyperthermia, pain shock and physical training (Vaschenko and Kotsyuba 2008).

The histochemical procedure for detecting NADPH-d and/or immunohistochemical detection of the location of NOS has been used in different species of invertebrates, including various gastropod molluscs such as *Limax maximus* (Gelperin 1994), *Helix aspersa* (Cooke et al. 1994), *Helix pomatia* (Huang et al. 1997), *Lymnaea stagnalis* (Moroz et al. 1994), *Pleurobranchia californica* (Moroz and Gillette 1996), and marine bivalve molluscs such as *Ruditapes philippinarum*, *Callithaca adamsi*, *Mercenaria stimpsoni*, the brackish-water *Corbicula japonica* and the freshwater *Nodularia vladivostokensis* and *Cristaria tuberculata* (Pimenova 2008). Furthermore, there is physiological evidence that NO is involved in many regulatory functions in molluscs, such as inhibition of nociception (*Cepaea nemoralis*, Kavaliers et al. 1998), withdrawal behavior (*Helix lucorum*, Malyshev and Balaban 1999) and

P. Rigon · M. Achaval
 Programa de Pós-Graduação em Neurociências Instituto de
 Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande
 Do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

P. Rigon · J. de Castilhos · M. Achaval
 Laboratório de Histoфизиologia Comparada, Departamento de
 Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
 Universidade Federal do Rio Grande Do Sul (UFRGS),
 Porto Alegre, RS, Brazil

L. Saur · M. F. Rodrigues · L. L. Xavier (✉)
 Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de
 Biologia Celular e Tecidual, Faculdade de Biociências,
 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, 90619-900 Porto Alegre,
 RS, Brazil
 e-mail: llxavier@pucrs.br

ink defense system of *Sepia* (Palumbo 2005), among other functions.

Nociception is a sensation resulting from injuries or potentially damaging stimuli, which produces a range of behavior to protect the injured tissues, such as avoidance reflex, escape or immobilization of the damaged area (Fields 1987).

Most invertebrates can detect and respond to nociceptive or aversive stimuli and exhibit nociceptive responses similar to those of vertebrates (Smith 1991). *Aplysia californica* has responses similar to those found in mammals. Mechanical or electrical nociceptive stimulation applied to the integument of this snail produced a series of responses including local body withdrawal, mucus liberation, siphon and gill withdrawal, opaline and ink liberation, escape locomotion and increased respiratory behavior (Kandel 1979; Walters and Erickson 1986). Nociceptive thermal stimulus has been shown to produce defensive behavior in the snail *Megalobulimus abbreviatus* (Achaval et al. 2005) and in other snails such as *Aplysia californica*, *Cepaea nemoralis*, *Megalobulimus sanctipauli*, *Helix lucorum*, *Helix aspersa*, *Helix pomatia*, *Limax maximus* (Burrowes et al. 1983; Kavaliers et al. 1983; Walters 1987; Kavaliers 1989; Romero et al. 1994; Dyakonova et al. 1995).

Knowledge of NO distribution and function in invertebrates is much less comprehensive. The available data suggest that NO is an evolutionarily ancient signaling molecule occurring in many invertebrate groups and that in invertebrates its function is similar to that seen in mammals (Stefano and Ottaviani 2002; Palumbo 2005). In a previous study, the snail *M. abbreviatus* was submitted to non-functional (22°C) and non-thermal hot-plate stress (30°C) and only showed exploratory behavior. Nevertheless, the snails submitted to thermal stimulus (50°C) displayed biphasic avoidance behavior (Achaval et al. 2005).

One of the great challenges in neuroscience is the identification of the neurons involved in basic circuits of some behavior, including nociception. The location of NADPH-d activity in *Lymnae* suggests that NO participates in sensorial processes (Serfözö et al. 1998). Involvement of NO was demonstrated in the nociceptive circuits following peripheral nociceptive stimulation in the land snail *Cepaea nemoralis* (Kavaliers et al. 1998) and was found in sensory areas both in the central nervous system and the peripheral organs of *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica* and *Pleurobranchaea californica* (Moroz et al. 1993; Elphick et al. 1995; Moroz and Gillette 1996; Moroz 2006). NO seems to play a key role in sensory processing mechanisms.

Thus, in order to establish a morphofunctional approach in the nociceptive circuit in *M. abbreviatus*, our aim was to identify the NADPH-d activity in neurons, neuronal subsets and nerve fibers after thermal aversive stimuli (3, 6, 12, 24 h) in different regions of the pedal ganglia of

M. abbreviatus, using NADPH-diaphorase histochemistry. A semi-quantitative analysis of NADPH-d activity in different ganglionic areas is proposed, in an attempt to determine the variation of NO in the nociceptive circuit. In order to precisely locate the NADPH-d activity, optical density was measured within the neuronal body and in the neuropilar areas.

Materials and methods

Animals

Young and adult *M. abbreviatus* (25 adults and 25 young) collected from the county of Charqueadas, RS, were kept in screened terrariums with a 12-h light/dark cycle, controlled temperature (20–25°C), with lettuce and water ad libitum. The experiments were performed in the month of November (Spring).

The adult animals were identified by the presence of a pink coloring around the edge of the shell, an average shell length of 7.5 ± 0.5 cm and width of 4.0 ± 0.2 cm and weight from 61 to 78 g. The young animals had no pink coloring around the edge of the shell, the average length was 4.0 ± 0.2 cm and width 2.9 ± 0.3 cm and the weight was 12–24 g. Every effort was made to minimize discomfort and the number of animals used. All procedures employed are in accordance with Brazilian Laws concerning animal research (Law nr 11.794).

Experimental procedures

Thermal aversive stimulus

Experiments were performed on 25 adult snails and 25 young snails, *M. abbreviatus*. The snails (adult and young) were divided into 4 groups of 5 snails and received a thermal stimulus of 50°C on a hot plate (Socrel, model-DS37, Italy) and were killed 3, 6, 12 and 24 h after the stimulus. The control groups (5 adult snails and 5 young snails) were not submitted to thermal stimulus. To minimize the stress due to novelty, the snails were allowed to rehydrate in individual humid chambers, 2 h prior to the experiments. Additionally, to avoid the probable effect of the lack of humidity on the substrate during the exposure of snails on the hot plate, a plastic film covered with 10 ml of water was placed over the plate. It was then necessary to wait for the plate to reacquire the predetermined temperature (Achaval et al. 2005; Swarowsky et al. 2005). Nociceptive thresholds of individual snails were determined by measuring the latency of their avoidance or withdrawal behaviors to thermal stimuli. The measurement of the latency started at the moment when the snail was

placed on the hot plate and ended immediately after the animal lifted the head-foot (HF) complex to a minimum of 1 cm above the plate (Achaval et al. 2005; Swarowsky et al. 2005). Then, the snails were quickly removed from the hot plate. All the experimental procedures were carried out during daylight hours. The animals were stimulated at different times in order that they could all be killed at the same mid-period (14–17 h), in order to eliminate variables, because terrestrial gastropod species have nocturnal habits (Chase 2002).

Histochemical procedure

In order to visualize the neurons that produce nitric oxide, the NADPH-diaphorase histochemical technique was used. Briefly, animals were anesthetized in a menthol solution for 30 min. Then, the ganglia of the CNS were removed and fixed in 4% paraformaldehyde diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for 4 h at room temperature. After which, they were cryoprotected in 30% sucrose in PB at 4°C until they sank. The ganglia were sectioned (50 µm) using a cryostat (Leitz, Germany). The slices were then preincubated in a solution containing 12 µL of Triton X-100 (Sigma, USA) diluted in 100 ml of PB at room temperature for 5 min. After, the slices were incubated in a solution containing 5 mg of NADPH (Sigma, USA) and 3 mg of NBT (Sigma, USA), diluted in PB for 1 h and 30 min at 37°C. They were then washed in PB, mounted on gelatinized slides, dehydrated in alcohols, cleared in xylol and covered with Permount and coverslips. The control technique was carried out by incubating some sections without substrate.

Regarding the present study, some technical factors should be taken into account. We agree that an association of NADPH-diaphorase histochemistry with NOS immunohistochemistry is the best choice to show NO-positive neurons and observe changes in nitrergic activity. However, in our laboratory, exhaustive attempts were made to perform NOS immunohistochemistry in the pedal ganglia of *M. abbreviatus* using different antibodies and different concentrations, without success.

Optical densitometry

The NADPH-d activity was evaluated using regional and neuronal semi-quantitative optical densitometry (Swarowsky et al. 2005; Xavier et al. 2005; Vaschenko and Kotsyuba 2008; Viola et al. 2009). Regional densitometry is a measurement of absorbance generated by the NADPH-d reaction product, formazan, in all the tissues, including neurons, glia and fibers, while neuronal optical densitometry is the same measurement performed only in the neuronal cytoplasm (Swarowsky et al. 2005; Xavier

et al. 2005; Vaschenko and Kotsyuba 2008; Viola et al. 2009). For this purpose, a Nikon-Eclipse E-600 microscope (500x; Japan) was employed together with Image Pro-Plus Software 6.0 (Media Cybernetics, USA). Digitized images of sections were obtained from the selected areas using a high-resolution CCD camera (Pro-Series High Performance). A 15.050 µm² sampling box (AOI-area of interest) was placed over the anterior, medial, lateral and posterior neuronal subsets and the neuropilar areas (NPA1 and NPA2) of the pedal ganglia (Fig. 1a), and the RGB (Red Green Blue) images obtained were converted into black and white digital images (8 bits-256 gray scale). In an attempt to measure the neuronal optical densitometry, a 280 µm² AOI was placed over the cytoplasm of some neurons (5 cells in each section) in these areas. All lighting conditions and magnifications were held constant between sections and areas; additionally, the investigator was unaware of the experimental groups from which the analyzed sections were obtained. The background correction was performed according to the formula previously described (Xavier et al. 2005). Additionally, the neuronal diameter of NADPH-d-positive neurons was measured using the same software.

Statistical analysis

Data are presented as means ± SD. The differences in the latency time between young and adult snails were analyzed using a *t*-test ($P < 0.05$). The regional and neuronal optical density measurements obtained from the aforementioned regions were compared between young and adult animals and at different times of survival after thermal stimulation versus the control group, using a two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test *post hoc* ($P < 0.05$). All statistical procedures were performed in SPSS 11.5 software.

Results

In *M. abbreviatus*, the ganglionic neurons were categorized by soma size, according to reviews from Zancan et al. (1997). Small neurons (<20 µm), medium neurons (21–50 µm), large neurons (51–110 µm) and giant neurons (>110 µm) were defined in this pulmonate snail.

No staining occurred in the absence of β-NADPH in the incubation medium; thus, we can be assured that the positive histochemical reaction observed in some neurons is β-NADPH-dependent.

To observe the activity of the NADPH-d-positive neurons, three representative horizontal areas were chosen from the pedal ganglia of both young and adult *M. abbreviatus* and the connective tissue septa (containing vessels) that

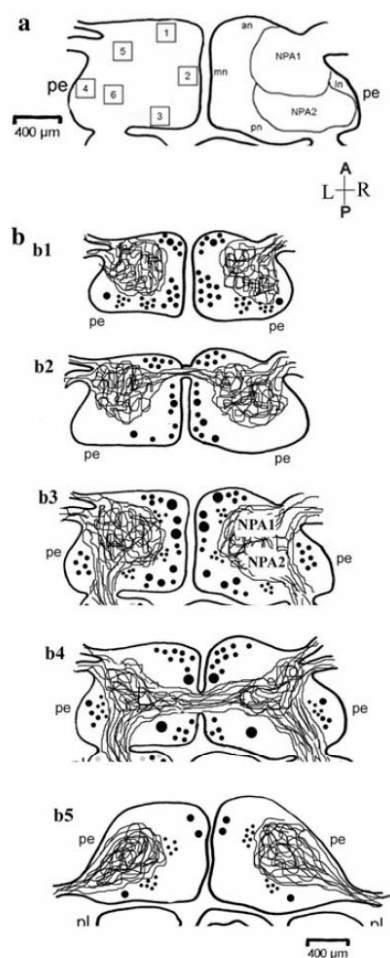


Fig. 1 **a** Schematic representation of the pedal ganglia showing the positions of the sampling boxes ($15.050 \mu\text{m}^2$) placed over the analyzed regions: 1- anterior neurons (an), 2- medial neurons (mn), 3- posterior neurons (pn), 4- lateral neurons (ln), 5- neuropilar area 1 (NPA1) and 6- neuropilar area 2 (NPA2). **b** Schematic representation of the pedal ganglia (pe) sectioned at different levels, displaying the NADPH-d-positive neuronal distribution (circles) and nerve fibers *M. abbreviatus*. These figures are representative of young and adult animals. *b1* and *b2*: ventral sections; *b3* and *b4*: medial sections; *b5*: dorsal section. Neuropilar 1 (NPA1) and neuropilar 2 (NPA2) areas. A Anterior, P posterior, L left and R right. Scale bar $400 \mu\text{m}$

subdivided the different regions of neuronal bodies. The first area was located ventrally to the major pedal commissure (MPC), the second area comprised this commissure and the third area was located dorsally to the same commissure (Swarowsky et al. 2005). In the first area, some sections were taken ventral and through the minor pedal commissure (mPC) (Fig. 1b). In addition, the connective tissue septa subdivided the pedal ganglion into different anatomical

regions: an anterior region with NADPH-d-positive neurons; a lateral region consisting of an NADPH-d-positive NPA1 and some positive neurons in the lateral border of the ganglia; a posterior region containing NADPH-d-positive NPA2 and positive posterior neurons. In front of this region, a further medial region containing an NADPH-d-positive neuronal group was detected (Figs. 1b, 2b). These positive neurons were distributed bilaterally and symmetrically in the pedal ganglia of both young and adult animals.

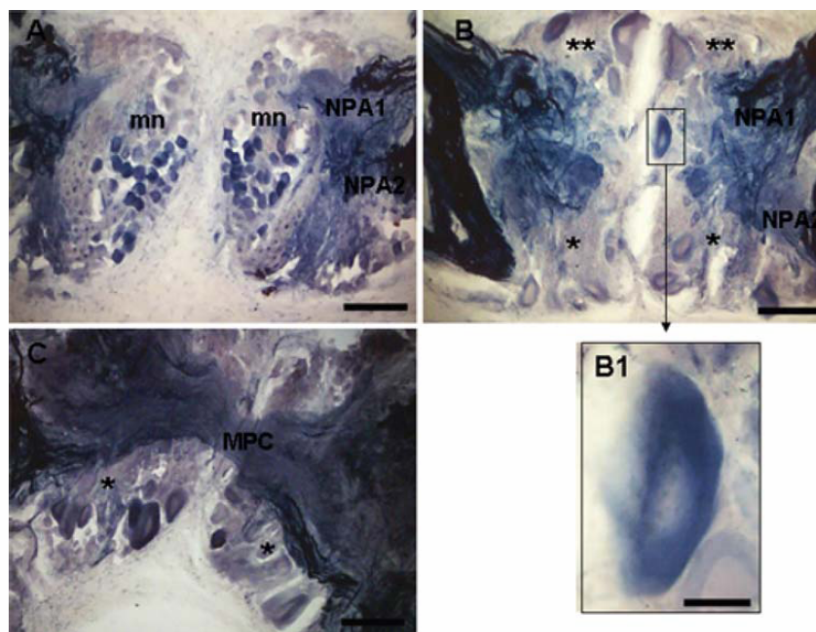
In the anterior region of the ganglia, at medial level sections, a pair of large positive neurons ($108 \mu\text{m}$ in diameter) was found in adult animals, while two pairs of large positive neurons (89 and $100 \mu\text{m}$ in diameter) were found in young animals. Besides these cells, a group containing approximately 30 cells (20 – $25 \mu\text{m}$ in diameter) and another group (approximately 10 cells) of small neurons (13 – $19 \mu\text{m}$ in diameter) also exhibited enzymatic activity in both young and adult animals (Figs. 1b, 2b). The latter neuronal group was in continuity with the anterior positive neuronal subset observed in ventral sections. Immediately dorsal to the MPC, two pairs of NADPH-d-positive large neurons ($108 \mu\text{m}$ in diameter) were identified in the anterior medial region in both young and adult animals.

In the lateral region of the pedal ganglia of young animals, approximately 15 medium-sized neurons (25 – $32 \mu\text{m}$ in diameter) together with a single large neuron ($82 \mu\text{m}$ in diameter) were identified as NADPH-d-positive in medial sections of pedal ganglia. In adult animals, the lateral labeling was very similar, though with approximately 10 small positive neurons (9 – $14 \mu\text{m}$ in diameter), besides the large neurons.

In the posterior region of ganglia from both young and adult animals, three pairs of large positive neurons (105 – $108 \mu\text{m}$ in diameter) were situated in ventral sections, while a cluster of 20 medium-sized neurons (40 – $45 \mu\text{m}$ in diameter) and 15 small-sized neurons ($14 \mu\text{m}$ in diameter) were located nearer the neuropile (Figs. 1b, 2c). Besides these neurons, a pair of giant positive neurons ($158 \mu\text{m}$ in diameter) was also found in medial sections. At the most dorsal point from the MPC, an NADPH-d neuronal subset (20 cells) of small-sized neurons ($15 \mu\text{m}$ in diameter) was detected, together with another pair of large positive neurons ($107 \mu\text{m}$ in diameter).

A larger NADPH-d-positive subset was also identified on the medial region of the ventral sections, surrounding the anterior and posterior margins of the MPC, which contained approximately 40–50 neurons (39 – $41 \mu\text{m}$ in diameter) (Figs. 1b, 2a). Within this group, three pairs of giant positive neurons (133 – $156 \mu\text{m}$ in diameter) were also visualized (Fig. 2b). More dorsally to the MPC, approximately 20 small- ($15 \mu\text{m}$ in diameter) and 20 medium-sized NADPH-d neurons (23 – $49 \mu\text{m}$ in diameter) were found on the medial surface of the ganglion.

Fig. 2 Digitized images of the different areas of the pedal ganglia of *M. abbreviatus* submitted to NADPH-d histochemistry. **a** Ventral area of the pedal ganglia of an adult animal showing NADPH-d-positive neurons in medial region (mn) and neuropilar areas NPA1 and NPA2. Scale bar 250 μ m. **b** Section through the medial region of the pedal ganglia of a young animal. Note the anterior neurons (double asterisk), posterior neurons (asterisk) and neuropilar areas NPA1 and NPA2. Scale bar 250 μ m. **(b1)** Higher magnification of the boxed area in **(b)**. Note the giant neuron located in the medial region (named Pd4). Scale bar 100 μ m. **c** Section through the major pedal commissure (MPC) of the pedal ganglion, showing the posterior NADPH-d-positive neuronal cluster (asterisk). Scale bar 250 μ m



The neuropile of the pedal ganglia and their nerve trunks exhibited intense activity in both young and adult animals. NADPH-d fibers were also identified in both pedal commissures (ventral and principal). The same differentiation was detected in both groups of animals using NADPH-d histochemistry in sections from the medial, dorsal and ventral regions, where the neuropilar area of the pedal ganglion displayed two NADPH-d-positive regions: NPA1 and NPA2 (Fig. 2a, b). NPA1 was located behind the anterior neuronal region, extending from the lateral border to the medial surface of the ganglion. It was continuous with the point of emergence of the anterior pedal nerve. NPA2 was posterior to the NPA1. In sections through the MPC, both neuropilar areas lay behind the commissure, and the NPA1 was confined to a small lateral area.

The nociception induction protocol was effective in all tested animals, showing no differences in latency time between young and adult snails (young, Mean = 29.2 s, SD = 4.1 s; adults, Mean = 30.7 s, SD = 3.8 s) ($P > 0.05$).

The anterior neurons of the pedal ganglia of the young animals stimulated at 50°C and killed at 3, 6 and 12 h after aversive stimulus displayed a significant increase ($P < 0.01$) in NADPH-d activity when compared with the control groups using both regional and neuronal optical density (OD). In the same region of the ganglia, a significant increase in the regional NADPH-d activity was found in adult animals killed 3, 6 and 24 h after thermal stimulus ($P < 0.001$). When we analyzed the neuronal NADPH-d

activity in adult animals, we observed increases 6, 12 and 24 h after thermal stimulus ($P < 0.01$) (Fig. 3a, b). Comparing the NADPH-d activity in the anterior neurons of pedal ganglia of young and adult animals, a significant decrease in regional optical density was found in the adult animals killed 3 h ($P < 0.01$) and 12 h ($P < 0.001$) after stimulus and an increase in NADPH-d activity in the adult animals killed 24 h after stimulus ($P < 0.001$). Analyzing the neuronal optical density in the anterior neurons of pedal ganglia, decreases in NADPH-d activity were observed in the adult animals, in the groups: control ($P < 0.001$); 3 h ($P < 0.001$); 6 h ($P < 0.01$); and 12 h ($P < 0.001$). As observed with regional optical density, a significant increase in neuronal NADPH-d activity was found in the adults killed 24 h after stimulus ($P < 0.001$) (Fig. 3a, b).

In the lateral region, the regional NADPH-d activity of the young snails submitted to thermal stimulus and killed 6 h after stimulation exhibited a significant increase in relation to the control animals ($P < 0.01$). The neuronal OD in young animals also displayed a significant increase at 3 and 6 h after stimulus ($P < 0.05$). In adult animals, in this same area of the pedal ganglia, the regional OD was significantly lower in the control group when compared with animals killed 3, 6 and 24 h after stimulus ($P < 0.05$), and neuronal OD was significantly higher in animals killed 3, 6, 12 and 24 h after the stimulus when compared with controls ($P < 0.05$) (Fig. 3c, d).

Analyzing the differences between NADPH-d activity in the lateral neurons of pedal ganglia of young and adult

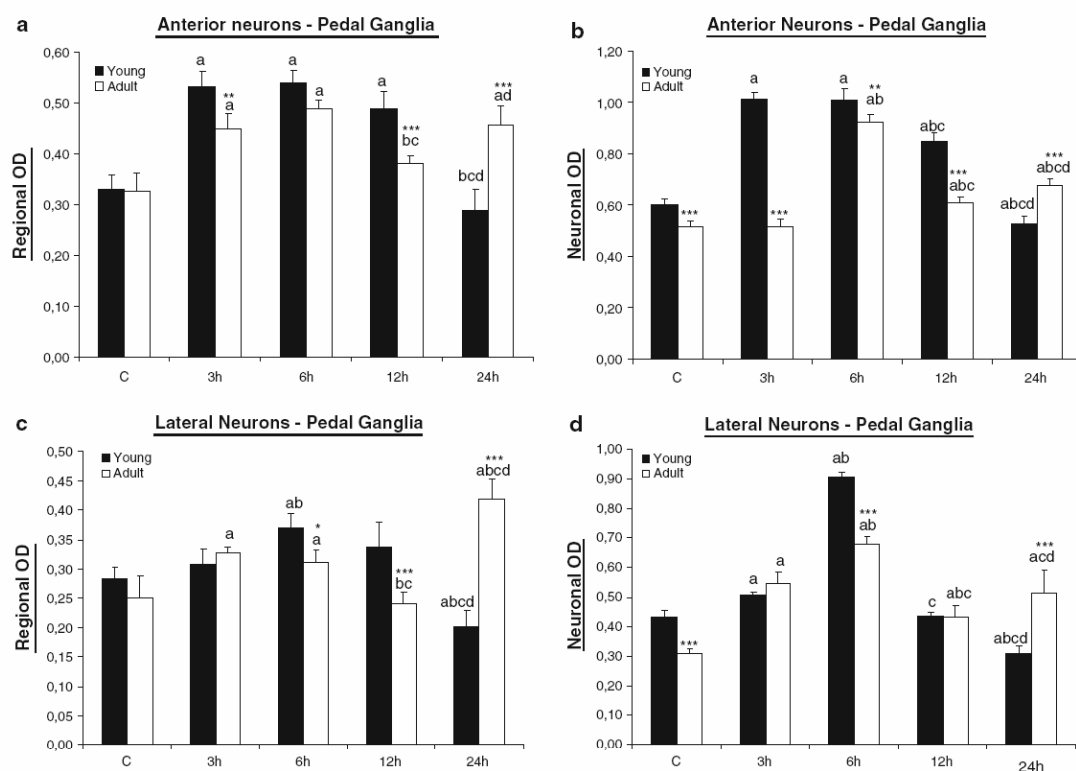


Fig. 3 Optical density (OD) measurements (mean \pm SD) obtained from different experimental groups at different periods of survival, showing the effects of thermal stimulus on the anterior (a and b) and lateral (c and d) NADPH-d-positive neurons in the pedal ganglia of *M. abbreviatus*. In the graphs a = $P < 0.05$ when compared with control; b = $P < 0.05$ when compared with animals killed 3 h after

stimulus; c = $P < 0.01$ when compared with animals killed 6 h after stimulus; d = $P < 0.05$ when compared with animals killed 12 h after stimulus; asterisks indicate the difference obtained when young and adult animals with the same treatment were compared (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$) (two-way ANOVA, Tukey test)

animals, a decrease was observed in the values of regional optical density in the adult animals killed 6 h ($P < 0.05$) and 12 h ($P < 0.001$) after stimulus while an increase was seen in NADPH-d activity in the adult animals killed 24 h after stimulus ($P < 0.001$). With the neuronal OD measurements obtained from the same region, a decrease was found in the OD of control adult animals and adult animals killed 6 h after stimulus ($P < 0.001$) while an increase was seen in the NADPH-d activity of adult animals 24 h after stimulus ($P < 0.001$) when compared with young animals submitted to the same treatment (Fig. 3c, d).

The regional OD in medial neurons from the pedal ganglia of young animals displayed a significant increase in NADPH-d activity in animals killed 3 and 6 h after stimulus ($P < 0.01$), and the neuronal OD was significantly increased at 3, 6 and 12 h after stimulus ($P < 0.001$). In adult animals, regional OD displayed a significant increase at 6 and 24 h after stimulus ($P < 0.001$) and there

was an increase in neuronal NADPH-d activity at 3, 6, 12 and 24 h after stimulus ($P < 0.001$) (Fig. 4a, b).

Comparing the regional OD in the medial neurons of pedal ganglia of young and adult animals, we noticed a significant decrease in the adult animals killed 6 h after stimulus and an increase in the OD of adult animals 24 h after stimulus ($P < 0.001$). In relation to the neuronal optical density, in adult animals were observed decreases in the NADPH-d activity 3, 6 and 12 h after stimulus and an increase of this activity 24 h after stimulus, when these were compared with young animals ($P < 0.001$) (Fig. 4a, b).

In the posterior neurons of the pedal ganglia of young animals killed 6 and 12 h after aversive stimulus, regional OD revealed a significant increase in NADPH-d activity ($P < 0.01$). In addition, in young animals killed 3, 6 and 12 h after aversive stimulus the neuronal OD was significantly higher when compared with the control group ($P < 0.001$), the young animals that were killed 24 h after

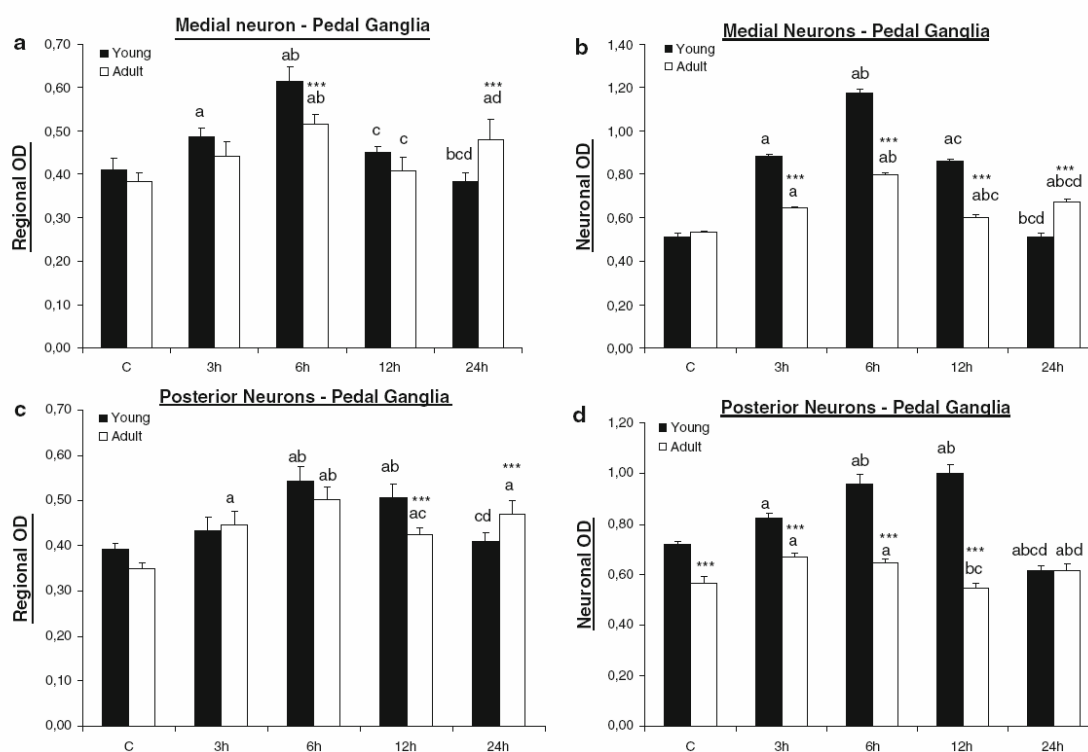


Fig. 4 Optical density (OD) measurements (mean \pm SD) obtained from different experimental groups at different periods of survival, showing the effects of thermal stimulus on the medial (a and b) and posterior (c and d) NADPH-d-positive neurons in the pedal ganglia of *M. abbreviatus*. In the graphs a = $P < 0.05$ when compared with control; b = $P < 0.05$ when compared with animals killed 3 h after

stimulus; c = $P < 0.01$ when compared with animals killed 6 h after stimulus; d = $P < 0.05$ when compared with animals killed 12 h after stimulus; asterisks indicate the difference obtained when young and adult animals with the same treatment were compared (** $P < 0.001$) (two-way ANOVA, Tukey test)

stimulus presented a decrease in the neuronal OD in relation to the respective control group. In this region, when analyzing the regional OD of adult animals, an increase was detected in NADPH-d activity at all the tested times when compared with control ($P < 0.01$), and in the analysis of neuronal OD of adults in the same region an increase was observed in NADPH-d activity of animals killed 3, 6 and 24 h after stimulus ($P < 0.001$) (Fig. 4c, d).

Comparing the regional OD in the posterior neurons from pedal ganglia of young and adult animals, a decrease was observed in the OD of adult animals killed 12 h after stimulus and an increase in the OD of adult animals 24 h after stimulus ($P < 0.001$). When analyzing the neuronal OD in adult animals, decreases were observed in the control group and animals killed 3, 6 and 12 h after stimulus ($P < 0.001$) (Fig. 4c, d).

In NPA1, intense NADPH-d activity was detected, with a significant increase in both young and adult animals stimulated with hot plate and killed 6 and 12 h after

stimulus ($P < 0.01$). In NPA2, no significant increase in NADPH-d activity was observed and there were no differences between young and adult animals, submitted to the same treatment (Fig. 5).

Discussion

Using the NADPH-d histochemical procedure, we demonstrated that the distribution of nitroergic neurons from the pedal ganglia is very similar in both young and adult *M. abbreviatus*. These nitroergic neuronal elements were present in the anterior, lateral, medial and posterior regions of the ganglia, while nitroergic fibers were also identified in the neuropilar areas. When the snails were submitted to thermal stimulus and killed some hours after, we observed that in some areas of the pedal ganglia, such as NPA1, anterior, medial, lateral and posterior neurons present modified NADPH-d activity in relation to nociceptive

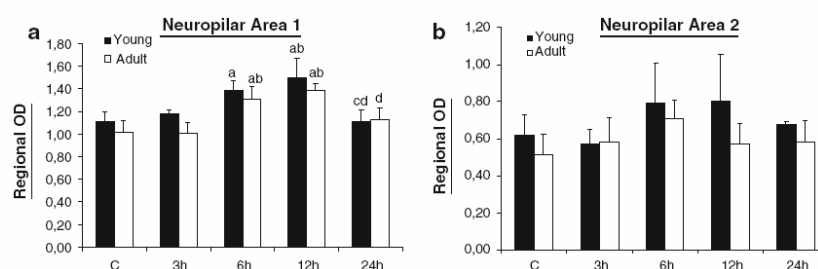


Fig. 5 Optical density (OD) measurements (mean \pm SD) obtained from different experimental groups at different periods of survival, showing the effects of thermal stimulus on the neuropilar areas NPA1 (a) and NPA2 (b) in the pedal ganglia of *M. abbreviatus*. In the graphs $a = P < 0.01$ when compared with control; $b = P < 0.001$

when compared with animals killed 3 h after stimulus; $c = P < 0.01$ when compared with animals killed 6 h after stimulus; $d = P < 0.01$ when compared with animals killed 12 h after stimulus (two-way ANOVA, Tukey test)

stimulus. In young animals, a pattern of NADPH-d activity was found, showing increases in the activity of this enzyme 3, 6 and 12 h after stimulus and a decrease in this activity, returning to the basal levels 24 h after stimulation. In adults, similar patterns of NADPH-d activity were observed in relation to young snails; however, a distinct increase in NADPH-d activity was found 24 h after stimulus.

When analyzing our results it is possible to conclude that in the pedal ganglia the distribution of the NADPH-d neurons is very similar to that of the 5-HT-labeled neurons, which was previously described by Swarowsky et al. (2005). With the exception of the neuronal subset from the lateral area, all other NADPH-d-positive areas found in our study (anterior neurons, medial neurons, posterior neurons, NPA1 and NPA2) were also positive for serotonergic activity in the study from Swarowsky's. Moreover, as in the immunohistochemical procedure for 5-HT (Swarowsky et al. 2005), the NPA1 is strongly labeled with the NADPH-diaphorase.

In the medial region of the pedal ganglia of both young and adult *M. abbreviatus*, besides other neurons, a pair of giant NADPH-d neurons observed in the medial region of the pedal ganglia is of special interest. These NADPH-d neurons also have the same location as the giant 5-HT neuron in *M. abbreviatus* (Swarowsky et al. 2005) and probably correspond to the Pd4 neuron in *H. lucorum* (Balaban et al. 2001), which was shown to be involved in motor behavior and modulation of withdrawal behavior.

A certain homology may be suggested between the anterior NADPH-d-positive neurons of the pedal ganglia and some serotonergic neurons described in *M. abbreviatus* as both are involved in the withdrawal response and elicited facilitation of the withdrawal behavior (Swarowsky et al. 2005).

In *H. lucorum*, the existence of a neural circuit involved in the withdrawal behavior after nociceptive stimulus has

been demonstrated (Balaban et al. 2001; Balaban 2002). This circuit is composed of differentiated neurons: sensory, motor, modulatory (pedal ganglion) and command (pleural and parietal ganglia) neurons that participate in the withdrawal behavior. A nociceptive stimulus from the periphery activates the command neurons that in turn activate the motor neurons that elicit the behavioral withdrawal reaction. In addition, the 5-HT-ir pedal neurons (located in the anterior region) are capable of modulating the synaptic input of the command neurons. Within this neuronal group, a large Pd4 neuron sends its processes to the pedal, pleural and parietal ganglionic neuropiles. On the other hand, the Pd4 neurons send peripheral processes and receive synaptic inputs from the anterior 5-HT-ir neurons. Each of these cells sends a process to the peripheral nerves (Balaban 2002), which facilitates synaptic response in the underlying network.

The aforementioned components of the neural circuit have been demonstrated in *M. abbreviatus* (Swarowsky et al. 2005). Thus, this may suggest the involvement of NO in this circuit, given that the pedal anterior serotonergic neurons and the giant 5-HT-ir neurons are also NADPH-d positive. Furthermore, this anterior group and these giant neurons were labeled using the method of retrograde transport of cobalt into the pedal nerves (Malysz 2002). Hence, demonstrating that both neuronal elements send processes to the periphery and therefore provide further evidence that these cells are homologous. However, to satisfy the necessary criteria for establishing such neuronal homology, it would be necessary to obtain the electrical recordings of these neurons in future studies (Bulloch and Ridgway 1995).

It is possible to suggest the involvement of the lateral and posterior clusters of NADPH-d-positive neurons found in the pedal ganglia of *M. abbreviatus* in the nociceptive circuit, given that these regions display a significant increase in NADPH-d activity after thermal stimulus.

In the neuropile, the fact that in the pedal ganglia the different markers (NADPH-d and 5-HT) identified the same distribution pattern (NPA1 and NPA2) is quite significant. In relation to NPA1, both young and adult animals stimulated at 50°C and killed 6 and 12 h after stimulation presented more NADPH-d activity than the control group. The NPA1 is located adjacent to the anterior NADPH-d-positive neurons, extending until the point where the anterior pedal nerves emerge. Thus, this may represent an area of anterior pedal nerve synaptic connections and/or projections originating from the foot. We cannot exclude the possibility that this neuropilar area receives axons from neuronal somata located in other ganglionic regions and may thus constitute an important area for the integration of the motor circuit proposed by Swarowsky et al. (2005). In relation to NPA2, no significant differences in NADPH-d activity were found in the course of time. As there was also no increase in 5-HT-ir after nociceptive stimuli (Swarowsky et al. 2005), NPA2 may be involved in other functions and not directly in the modulation of withdrawal behavior. However, the distribution of NADPH-d-positive fibers was found in both young and adult *M. abbreviatus*, which suggests that NO is involved in the motor behavior. Recently, it has been recognized that there is a significant morphological and functional overlap between 5-HT and NO. This has prompted the suggestion that NO may modulate presynaptic 5-HT release (Straub et al. 2007).

NO is evidently tonically involved in forming the background activity of serotonergic neurons, mediates or enhances the excitatory actions of serotonin or serotonergic neurons and appears to be involved in the mechanism of synaptic transmission from the common train input or has a role in generating endogenous train activity by presynaptic neurons. It is possible that NO is a second messenger for the excitatory action of serotonin. This is supported by data showing that the effects of serotonin are imitated by NO donors and that these effects are suppressed by blockade of NO synthesis (D'yakonova 2002).

Serotonin and NO may be co-transmitters in the presynaptic neurons. Thus, serotonin and NO may directly regulate the functioning of the serotonergic system in the snail CNS. They have excitatory effects on all the serotonergic neurons investigated in *H. lucorum* and synchronize their activity, acting on the common synaptic inputs which, apparently, are also serotonergic (D'yakonova 2002). It may be suggested that, in *M. abbreviatus*, the same co-transmission exist, given that the 5-HT-ir neurons described in this species are found in a similar location to the NADPH-d-positive neurons. Moreover, the increase in 5-HT-ir (Swarowsky et al. 2005) and NADPH-d activity was very similar, with the highest expression being seen 6 h after nociceptive stimulus.

In mammals NO acts as a second messenger that activates the guanylyl cyclase and thus increases the synthesis of cyclic guanosine monophosphate (cGMP). Several lines of evidence have shown that NO and cGMP are involved in nociceptive processing, but there is some controversy regarding the pronociceptive or antinociceptive effects of NO and cGMP. Possible explanations for these apparent discrepancies are that NO and cGMP have different actions on neuronal background activity and excitability, different actions at the spinal and supraspinal level and different anti- or pro-nociceptive effects depending on their concentration. NO may induce pronociceptive effects at low concentrations and antinociceptive ones at higher concentrations (Hoheisel et al. 2005; Zakaria et al. 2005).

The differences found in NADPH-d intensity between young and adult control groups could suggest that NO is necessary in the development in *M. abbreviatus*, given that in young animals this activity was more intense. In the developing nervous system, the location of NADPH-d reactivity suggests that NO mainly participates in sensory processes (Serfözö et al. 1998; Serfözö and Elekes 2002). The production of NO is a key step for some early phases of neurogenesis, such as neural cell proliferation and migration, and the position of some positive cells in the urodele amphibian *Pleurodeles waltl* is coincident with that region that is known to be occupied by serotonergic neurons (Moreno et al. 2002). Several studies carried out in other species of molluscs have shown that NOS expression is initiated in the CNS during the developmental stages (Serfözö et al. 1998; Serfözö and Elekes 2002). During the development, NO is also involved in axonal outgrowth and synaptogenesis (Bicker 2001). It is possible to suggest that in *M. abbreviatus* NO could perform the aforementioned functions.

Our study was the first to associate a semi-quantitative evaluation of NADPH-d activity and nociception in *M. abbreviatus*. Thus, information about NADPH-d activity in this animal model is non-existent, and there is no previous information about the differences between young and adult animals in the literature. In fact, more studies are needed to understand these differences, but we can consider some hypotheses about our findings that could be tested in future studies: One is that there is a difference in the NOS activity between young and adult snails that could be due to differences in the channel composition of the plasma membrane, this phenomenon is well documented in some brain areas of humans and other vertebrates, in which changes were found in the number and types of calcium channels with aging, these differences are probably associated with changes in NOS activity (Surmeier 2007); another hypothesis is that increases in the nitergic activity found in young animals could be related to the increased adaptability of the nervous system in these animals, since NO is involved in axonal outgrowth and the formation of

new synapses during development (Bicker 2001) and probably after some stimulus, such as nociceptive stimulus.

In conclusion, the histochemical experiments on NOS distribution point to a central role for NO in nociceptive regulation in *M. abbreviatus*, and it may be suggested that the areas of the pedal ganglia directly involved in the modulation of the nociceptive behavior are NPA1, anterior, medial, lateral and posterior neurons, as they present modification to NADPH-d activity in relation to nociceptive stimulus.

We recognize that further studies of the pedal ganglia of *M. abbreviatus* are necessary to achieve a better understanding of the basic processes underlying the nitric action in the nociceptive circuit.

Acknowledgments This work was supported by the FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN.Net)" # 01.06.0842-00, CNPq, PRONEX, CAPES, FAPERGS. We are grateful to Antonio G. Severino for his technical assistance. M. Achaval is a CNPq investigator.

References

- Achaval M, Penha MA, Swarowsky A, Rigon P, Xavier LL, Viola GG, Zancan DM (2005) The terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus* as a useful model for nociceptive experiments: effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior. *Braz J Med Biol Res* 38:73–80. doi:10.1590/S0100-879X2005000100012
- Balaban PM (2002) Cellular mechanisms of behavioral plasticity in terrestrial snail. *Neurosci Biobehav Rev* 26:597–630. doi:10.1016/S0149-7634(02)00022-2
- Balaban PM, Bravarenko NI, Maksimova OA, Nikitin E, Jerusalemsky VN, Zakharov IS (2001) A single serotonergic modulatory cell can mediate reinforcement in the withdrawal network of the terrestrial snail. *Neurobiol Learn Mem* 75:30–50. doi:10.1006/nlme.1999.3953
- Bicker G (2001) Nitric oxide: an unconventional messenger in the nervous system of an orthopteroide insect. *Arch Insect Biochem Physiol* 48:100–110. doi:10.1002/arch.1062
- Bulloch AGM, Ridgway RL (1995) Comparative aspects of gastropod neurobiology. In: Breidback O, Kutsch W (eds) *The nervous systems of invertebrates: an evolutionary and comparative approach*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 89–113
- Burrowes WR, Assanah P, Stefano GB (1983) Behavioral effects of opiates on the land snail *Helix aspersa*. *Life Sci* 33:381–384
- Chase R (2002) *Behavior and its neural control in gastropod molluscs*. Oxford University Press, USA
- Cooke IRC, Edwards SL, Anderson CR (1994) The distribution of NADPH diaphorase activity and immunoreactivity to nitric oxide synthase in the nervous system of the pulmonate mollusc *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res* 277:565–572. doi:10.1007/BF00300230
- D'yakonova TL (2002) Interaction between serotonin and nitric oxide (NO) in the activation of the serotonergic system in the common snail. *Neurosci Behav Physiol* 32:275–282. doi:10.1023/A:1015062324019
- Dyakonova VE, Elofsson R, Carlberg M, Sakharov DA (1995) Complex avoidance behaviour and its neurochemical regulation in the land snail *Cepaea nemoralis*. *Gen Pharmacol* 26:773–777. doi:10.1016/0306-3623(94)00263-M
- Elphick MR, Kemenes G, Staras K, O'Shea M (1995) Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J Neurosci* 15:7653–7664
- Fields HL (1987) *Pain*. Mc Graw Hill Book Company, New York
- Garthwaite J, Boulton CL (1995) Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 57:683–706. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.003343
- Gelperin A (1994) Nitric oxide mediated network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature* 369:61–63
- Hoheisel U, Unger T, Mense S (2005) The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: different spinal and supraspinal action of enzyme blockers on rat dorsal horn neurones. *Pain* 117:358–367. doi:10.1016/j.pain.2005.06.023
- Huang S, Kerschbaum HH, Engel E, Hermann A (1997) Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J Neurochem* 69:2516–2528. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69062516.x
- Kandel ER (1979) *Behavioral biology of Aplysia*. WH Freeman Co, USA
- Kavaliers M (1989) Evolutionary aspects of the neuromodulation of nociceptive behaviors. *Amer Zool* 29:1345–1353. doi:10.1093/icb/29.4.1345
- Kavaliers M, Hirst M, Teskey GC (1983) A functional role for an opiate system in snail thermal behavior. *Science* 220:99–101. doi:10.1126/science.6298941
- Kavaliers M, Choleris E, Prato FS, Ossenkopp K (1998) Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail. *Brain Res* 809:50–57. doi:10.1016/S0006-8993(98)00844-0
- Malyshev AY, Balaban PM (1999) Synaptic facilitation in *Helix* neurons depends upon postsynaptic calcium and nitric oxide. *Neurosci Lett* 261:65–68. doi:10.1016/S0304-3940(98)01010-6
- Malysz T (2002) Distribuição dos nervos dos gânglios pedais e marcação da região posterior do pé do *Megalobulimus oblongus*. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Moreno N, López JM, Sánchez-Camacho C, González A (2002) Development of NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase in the brain of the urodele amphibian *Pleurodeles waltl*. *J Chem Neuroanat* 23:105–121. doi:10.1016/S0891-0618(01)00146-6
- Moroz LL (2006) Localization of putative nitric neuron in peripheral chemosensory areas and the central nervous system of *Aplysia californica*. *J Comp Neurol* 495:10–20. doi:10.1002/cne.20842
- Moroz LL, Gillette R (1996) NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. *J Comp Neurol* 367:607–622
- Moroz LL, Park JH, Winlow W (1993) Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport* 4:643–646
- Moroz LL, Winlow W, Turner RW, Bulloch AG, Lukowiak K, Syed NI (1994) Nitric oxide synthase-immunoreactive cells in CNS and periphery of *Lymnaea*. *Neuroreport* 5:1277–1280
- Palumbo A (2005) Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 142:241–248. doi:10.1016/j.cbpb.2005.05.043
- Pimenova EA (2008) Histochemical localization of NADPH-diaphorase-positive elements in the enteric nervous system of bivalve molluscs. *J Molluscan Stud* 74:1–9. doi:10.1093/mollusc/eym040
- Romero SMB, 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 C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 107:37–40

- Serfözö Z, Elekes K (2002) Nitric oxide level regulates the embryonic development of the pond snail *Lymnaea stagnalis*: pharmacological, behavioral, and ultrastructural studies. *Cell Tiss Res* 310:119–130. doi:10.1007/s00441-002-0589-9
- Serfözö Z, Elekes K, Varga V (1998) NADPH-diaphorase activity in the nervous system of the embryonic and juvenile pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Cell Tiss Res* 292:579–586. doi:10.1007/s004410051087
- Smith JA (1991) A question of pain in invertebrates. In: ILAR J Online. Available via http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/33_1_2/V33_1_2Question.shtml. Cited 27 Sep 2009
- Stefano GB, Ottaviani E (2002) The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. *Brain Res* 924:82–89. doi:10.1016/S0006-8993(01)03227-9
- Straub VA, Grant J, O'Shea M, Benjamin PR (2007) Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. *J Neurophysiol* 97:1088–1099. doi:10.1152/jn.01048.2006
- Surmeier DJ (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 6:933–938. doi:10.1016/S1474-4422(07)70246-6
- Swarowsky A, Montero AF, Xavier LL, Zancan DM, Achaval M (2005) Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: a semi-quantitative analysis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 141:230–238. doi:10.1016/j.cbpa.2005.05.045
- Teyke T (1996) Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia*. *Neurosci Lett* 206:29–32. doi:10.1016/0304-3940(96)12434-4
- Vaschenko MA, Kotsyuba EP (2008) NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker) under stress conditions: a histochemical study. *Mar Environ Res* 66:249–258. doi:10.1016/j.marenvres.2008.03.001
- Viola GG, Rodrigues L, Americo JC, Hansel G, Vargas RS, Biasibetti R, Swarowsky A, Gonçalves CA, Xavier LL, Achaval M, Souza DO, Amaral OB (2009) Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res* 1274:47–54. doi:10.1016/j.brainres.2009.04.007
- Walters ET (1987) Multiply sensory neuronal correlates of site-specific sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci* 7:408–417
- Walters ET, Erickson MT (1986) Directional control and the functional organization of defensive responses in *Aplysia*. *J Comp Physiol A* 159:339–351
- Xavier LL, Viola GG, Ferraz AC, Da Cunha C, Deonizio JM, Netto CA, Achaval M (2005) A simple and fast densitometric method for the analysis of tyroxine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Protoc* 16:58–64. doi:10.1016/j.brainresprot.2005.10.002
- Xie M, Hermann A, Kerschbaum HH (2002) Complementary distribution of NADPH-diaphorase and l-arginine in the snail nervous system. *Cell Tiss Res* 307:393–400. doi:10.1007/s00441-001-0493-8
- Zakaria ZA, Sulaiman MR, Somchit MN, Jais AM, Ali DI (2005) The effects of L-arginine, D-arginine, L-name and methylene blue on *channa striatus*-induced peripheral antinociception in mice. *J Pharm Pharm Sci* 8:199–206
- Zancan DM, Brauer M, Achaval M (1997) Monoamine-containing neurons in the central nervous system of *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Comp Biochem Physiol A* 118:765–772. doi:10.1016/S0300-9629(97)00056-X

4.3 - ARTIGO III

NITRIC OXIDE INCREASES NOCICEPTION IN THE SNAIL

Megalobulimus abbreviatus

Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology,
submetido em 02.12.2009

De: Editorial Express Mail System em nome de Comp Biochem Physiol Edit. Office

Enviada: qua 2/12/2009 07:16

Para: Leder Leal Xavier

Assunto: Submission to CBP A completed successfully

Dear Leder:

This email is to confirm that you have successfully completed your submission, titled

NITRIC OXIDE INCREASES NOCICEPTION IN THE SNAIL

to Comparative Biochemistry and Physiology
Part A: Molecular & Integrative Physiology.

Now that your submission is complete, we have disabled further access to it via the online submission form. This means that neither you nor any other person can access it. Your submission has been transferred to a 'secure holding tank' at Comparative Biochemistry and Physiology
Part A: Molecular & Integrative Physiology.

Thus, the url we sent you in the first confirmation email will no longer work. This is to protect your anonymity and ensure the confidentiality of your submission, subject to the technical caveats that you agreed to at step 1 of the submission (i.e. that it is impossible to offer a 100% guarantee of confidentiality).

The secure holding tank where your submission has been transferred is inspected periodically by the staff at Comparative Biochemistry and Physiology
Part A: Molecular & Integrative Physiology.

Once a staff member inspects it and verifies that your submission is complete, your manuscript is readable, and your submission is appropriate for this journal, it will be assigned a Manuscript ID number and an editor who will be in charge of it. You should expect to receive another email confirmation at this time.

Note that your manuscript ID number will be different from the submission ID number your submission has been temporarily assigned, 7119, to uniquely identify it while it is awaiting final inspection in the secure holding tank at Comparative Biochemistry and Physiology
Part A: Molecular & Integrative Physiology.

If you have questions about your submission, please contact "Comp Biochem Physiol Edit. Office" <cbpjrn1@editorialexpress.com>.

However please let a reasonable period of time elapse before making further inquiries (say at least 14 days), since the staff of Comparative Biochemistry and Physiology
Part A: Molecular & Integrative Physiology is not always able to inspect the submission holding tank on a daily basis.

Sincerely,

"Comp Biochem Physiol Edit. Office" <cbpjrn1@editorialexpress.com>

NITRIC OXIDE INCREASES NOCICEPTION IN THE SNAIL
***Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata)**

Paula Rigon^{a,b}; Juliana de Castilhos^b; Matilde Achaval^{a,b}; Léder L. Xavier^c

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: Léder Leal Xavier, PhD

E-mail address: llxavier@pucrs.br Phone : 55 51 33203545 Fax: 55 51 33203612

Address: Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga 6681, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

We study the involvement of nitric oxide (NO) in the latency response of the snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal and chemical stimuli and in the antinociception mediated by opioid receptors. Doses of the NO synthase inhibitor *N*^G-nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME (1 µg/kg, 10 µg/kg and 25 µg/kg) and the NO-releasing agent S-nitro-N-acetylpenicillamide, SNP (1 µg/kg, 10 µg/kg and 25 µg/kg) were administered to determine the effect of NO on latency responses. With the highest L-NAME dose (25 µg/kg), the response latency was significantly longer ($p < 0.001$) and with the highest SNP dose (25 µg/kg) the response latency was significantly shorter ($p < 0.001$) when compared with the other doses in control and saline groups. The 25 µg/kg dose of L-NAME produced an analgesic effect similar to that of morphine. We also observed that morphine-induced antinociception was significantly potentiated by L-NAME ($p < 0.05$) and decreased, but not blocked, by SNP ($p < 0.05$) in animals submitted to thermal and chemical stimuli. Thus, our study is the first to demonstrate in *M. abbreviatus* an interaction between NO and opioid systems, showing that NO has a pronociceptive effect in this animal model.

Keywords: antinociception, morphine, nitric oxide, nociception, noxious stimulus, snail

1. Introduction

Nitric oxide (NO) is an unstable gas that acts as a messenger molecule in a variety of systems (Cole et al., 2002). It has been shown to be involved in several different behaviors in vertebrates and invertebrates, such as nociception and modulation of opioid-induced analgesia (Przewlocki et al., 1993; Kawabata et al., 1994; Machelska et al., 1997; Kavaliers et al., 1998; Xie et al., 2002).

Invertebrates are widely used as animal models for neuroscience studies (Cristino et al., 2008; Gotow and Nishi, 2008; Grinkevich et al., 2008; Faust et al., 2009). When compared to vertebrates, gastropod mollusks are particularly useful for this kind of research, because they have a very simple nervous system, are easy to maintain, have very large neurons that can be easily accessed because they are located immediately under the connective tissue and, in addition show some important behavior patterns with a high degree of reproducibility, such as the withdrawal reflex (Kandel, 1979; Chase, 2002; Achaval et al., 2005; Swarowsky et al., 2005; Kalil-Gaspar et al., 2007; Feng et al., 2009).

Megalobulimus is a native South American genus, originally from Argentina, Brazil, Columbia and Uruguay that has spread to various parts of the Caribbean region, including Jamaica, Martinique and Barbados. It is widely used as a pet and, for the aforementioned reasons, increasingly employed as an animal model in neuroscience research (Romero et al., 1994; Zancan et al., 1994; Faccioni-Heuser et al., 2004; De Fraga et al., 2004; Dos Santos et al., 2005; Nóbrega et al., 2006). Recently, it has been used to investigate nociception induced by thermal and/or chemical stimuli (Achaval et al., 2005; Swarowsky et al., 2005; Kalil-Gaspar et al., 2007).

There are strong neurochemical similarities between the nociceptive processes that occur in vertebrates and mollusks, for example, NO is involved in many regulatory functions, such as inhibition of nociception (*Cepaea nemoralis*, Kavaliers et al., 1998), and withdrawal behavior (*Helix lucorum*, Malyshev and Balaban, 1999). Additionally, opioid peptides are involved in the modulation of various functions, including thermal avoidance behaviors (nociceptive responses) in mollusks such as *Cepaea nemoralis*, *Limax maximus*, *Megalobulimus sanctipauli* and *M. abbreviatus*. The administration of morphine sulfate, methionine-enkephalin or β -endorphin resulted in a significant increase in the latency of thermal avoidance behavior in mollusks (Romero et al., 1994; Achaval et al., 2005).

However, some studies into the role of NO in nociception, using rodents as animal models, have presented conflicting results, in part due to the complexity of both the behavior patterns and the nervous system in vertebrates. One example of this lack of consensus, is related to the pronociceptive effects of NO (Boettger et al., 2007; Tang et al., 2007; Gomaa et al., 2009; Miyamoto et al., 2009) or antinociceptive effects of NO (Menéndez et al., 2007; Gomaa et al., 2009; Hervera et al., 2009; Miclescu and Gordh, 2009) and their relation with the opioid system, in the vertebrate nervous system (Przewlocki et al., 1993; Machelska et al., 1997; Hervera et al., 2009; Leánez et al., 2009). In some of these cases, studies with mollusks, which have a very simple nervous system and well defined behavior patterns, can shed some light on the role of NO in nociception of invertebrates and vertebrates.

The aims of our study were to evaluate the effects of the NO synthase inhibitor, L-NAME, and the NO-releasing agent, SNP, on the behavioral responses to thermal (hot plate) and chemical (capsaicin) stimuli and to analyze the interaction between the analgesia induced by the opioid system and NO in the snail *M. abbreviatus* after thermal and chemical avoidance behaviors.

2. Material and Methods

2.1 – Animals

Our study involved the use of 420 adult snails *Megalobulimus abbreviatus*, collected in the south of Brazil (latitude -29° 57' 17" longitude 51° 37' 31"), which were kept in screened terrariums with a 12 h light/dark cycle, controlled temperature (20-25°C), with lettuce and water *ad libitum*. The experiments were performed in the month of December (summer).

Every effort was made to minimize discomfort and the number of animals used. All procedures employed are in accordance with Brazilian Laws concerning animal research (Law nr 11.794).

All the experimental procedures were carried out during daylight hours, at the same mid-period (14-17 h), in order to eliminate variables, because terrestrial gastropod species have nocturnal habits (Chase, 2002).

2.2 - Experimental Procedures

Our study was divided in two phases. The first phase consisted of finding the effective doses of L-NAME (Sigma; USA) and SNP (Sigma; USA) in response latency; in the second phase we tested the effect of L-NAME and SNP in the thermal (hot plate) and chemical (capsaicin) induced nociception, comparing the results with the antinociception induced by morphine and testing the effects of L-NAME and SNP in the antinociception generated by morphine. In the first phase the animals were divided into two main groups: L-NAME and SNP. The L-NAME group was subdivided into five subgroups according to the L-NAME doses ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (Control, Saline, L-NAME 1 μg , L-NAME 10 μg and L-NAME 25 μg) and the SNP group was subdivided into five subgroups according to the SNP doses ($\mu\text{g}/\text{kg}$): Control, Saline, SNP 1 μg , SNP 10 μg and SNP 25 μg , in this first phase of the study, 10 animals were used in each subgroup. In the second phase the animals were divided into two main groups according to the nociceptive stimulus: hot plate and capsaicin, these groups were subdivided into eight subgroups according to the treatment: 1- Control; 2-Saline; 3-Morphine (Cristália do Brasil S/A, São Paulo, SP, Brazil) (20 mg/kg); 4-L-NAME (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 5-Morphine (20 mg/kg) + L-NAME (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 6-SNP (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 7- Morphine (20 mg/kg) + SNP (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and 8-Morphine (20 mg/kg) + L-NAME (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) + SNP (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 20 animals were employed per subgroup. The drugs were injected into the intrahemocelic cavity through the anterior ventral zone of the foot, 15 min prior to aversive stimulus. Five minutes was the interval between the drug injections in the groups 5, 7 and 8. Each animal was used just once.

2.2.1- Thermal aversive stimuli

Individual hydrated snails were placed on a hot plate (Socrel, model-DS37, Comerio, VA, Italy) at a stressful thermal condition of 50°C and the latency response of their avoidance behavior was determined. Additionally, to avoid the probable effect of the lack of humidity on the substrate during the exposure of snails on the hot plate, a plastic film covered with 10 ml of water was placed over the plate. It was then necessary to wait for the plate to reacquire the predetermined temperature (Achaval et al., 2005; Swarowsky et al., 2005). Nociceptive thresholds of individual snails were determined by measuring the latency of their avoidance or withdrawal behaviors to thermal stimuli. The measurement of

the latency started at the moment when the snail was placed on the hot plate and ended immediately after the animal lifted the head-foot (HF) complex to a minimum of 1 cm above the plate (Achaval et al., 2005; Swarowsky et al., 2005) (Fig. 1). Then, the snails were quickly removed from the hot plate.

Fig. 1

2.2.2 – Chemical aversive stimuli

Individual hydrated snails received a chemical stimulus with 0.5% capsaicin solution (Sigma; USA) dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO; VETEC, Brazil). The snails were tested in Petri dishes (10 cm diameter) containing capsaicin aqueous films, at a room temperature of 22°C (Kalil-Gaspar et al., 2007). Nociceptive thresholds of individual snails were determined by measuring the latency of their aversive or withdrawal behavior. Measurement of the latency started at the moment when the snail was placed on a Petri dish and ended immediately after the animal lifted the head-foot complex to a minimum of 1 cm above the plate. The animals were then quickly washed in fresh water to avoid excessive exposure to capsaicin solution (Kalil-Gaspar et al., 2007).

2.3 - Statistical analysis

For all groups, data (means \pm SD) were statistically compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the *post hoc* Tukey test ($p < 0.05$), in SPSS 11.5 software.

3. Results

3.1 Dose determination of L-NAME and SNP

Using the hot plate protocol to evaluate the most effective doses of L-NAME and SNP, we found that only the 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose of L-NAME was able to increase the response latency when compared with controls ($p < 0.001$). The other tested doses (1 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) were ineffective (Fig. 2). Similarly, the 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dose of SNP was the only one that induced an increase in the nociception, represented by decreases in the time of response latency ($p < 0.001$) (Fig. 3). Thus, we chose 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ doses of L-NAME and SNP as a standard doses, to test the effects of nitric oxide in nociception of the terrestrial snail *M. abbreviatus*.

Fig. 2

Fig. 3

3.2 Effects of L-Name and SNP on nociception

As expected, in *M. abbreviatus*, the use of morphine induced an antinociceptive effect in the thermal and chemical stimuli, this antinociceptive effect was represented by significant increases in the response latency when animals that received morphine were compared with control and saline groups ($p < 0.001$) (Figs. 4 and 5).

Fig. 4

The L-NAME presents the same antinociceptive effect as morphine, increasing the response latency in these animals in relation to control and saline groups ($p < 0.001$) (Figs. 4 and 5).

Fig. 5

The effects of co-administration of L-NAME, five minutes after morphine administration showed that L-NAME is able to potentiate the basal morphine effects, promoting a strong increase in the antinociception when these animals were compared with control, saline, morphine and L-NAME groups in both nociception protocols, hot plate and capsaicin ($p < 0.001$) (Figs. 4 and 5).

The animals that received only a nitric oxide donor, SNP, displayed a reduced response latency in relation to the control groups, after thermal and chemical stimulation ($p < 0.05$) (Figs. 4 and 5).

The group that was treated with morphine and received SNP five minutes after, presented a significant decrease in the latency time when compared with the animals that received only morphine, in both protocols, hot plate ($p < 0.001$) and capsaicin ($p < 0.01$) (Figs. 4 and 5).

When SNP and LNAME were injected 5 and 10 minutes, respectively, after morphine administration, we noticed the determinant role of endogenous nitric oxide in nociceptive regulation in this snail. In the hot plate protocol, there was no significant difference in the latency time between the animals that received morphine + SNP + L-NAME and those that received morphine + L-NAME. In the protocol used to test the nociceptive response to chemical stimuli we found an increase in the latency time in the morphine + SNP + L-NAME group when compared with animals that received morphine + L-NAME ($p < 0.001$). Additionally, the use of L-NAME after morphine and SNP induces a significant increase in the response latency when compared with animals that received morphine and SNP, in both stimuli ($p < 0.001$) (Figs. 4 and 5).

4. Discussion

The results from the first phase of this study showed that the effects of a NOS inhibitor, L-NAME and a NO donor, SNP, are dose-dependent. Lower doses failed to induce significant changes in the response latency in our animal model. The minimal doses necessary to induce significant changes in the withdrawal behavior in the *M. abbreviatus* was 25 µg/kg of L-NAME and SNP. In the literature, there is very little information on drug doses used for nociceptive modulation by NO. However, our study shows that this dose (25 µg/kg) is much smaller than the doses used in another terrestrial mollusk, *Cepaea nemoralis*. In this mollusk, doses of 1000 µg/kg of L-NAME and SNP were required to change avoidance behavior using a hot plate protocol, doses of 100 µg/kg of L-NAME and SNP proved ineffective in this species (Kavaliers et al., 1998). The efficacy of the use of low doses of NO modulators probably indicates that nociceptive modulation by nitric oxide is more effective in *M. abbreviatus* than *Cepaea nemoralis*, characterizing *M. abbreviatus* as a very interesting model for this kind of study.

In our study we found that thermal and chemical stimuli are able to induce very similar withdrawal behavior in *M. abbreviatus*, these results indicate that both can be used to elicit nociception in this animal model. This may indicate that this mollusk has a single primitive nociceptive pathway that is used to detect both stimuli. Previous studies, using the same animal model suggest that this nociceptive pathway is modulated by opioids and the transient receptor potential channel-vanilloid 1 (TRPV1), a member of the transient receptor potential superfamily, a non selective cation channel which promotes calcium influx in vertebrate neurons when activated by vanilloids and noxious stimuli (Van der Stelt et al., 2004; Szolcsányi, 2004; Kalil-Gaspar et al., 2007; Miyamoto et al., 2009).

Our results show that morphine is able to promote analgesia in *M. abbreviatus* after thermal and chemical stimulation. This finding is very similar to those previously published regarding *M. abbreviatus* (Achaval et al, 2005., Kalil-Gaspar et al., 2007) and other terrestrial mollusks such as *Megalobulimus sanctipauli* (Romero et al., 1994) and *Cepaea nemoralis* (Kavaliers, 1992).

In our study the NOS blocker, L-NAME, was shown to produce an isolated anti-nociceptive effect, represented by significant increases in the response latency found in the

animals in the L-NAME group when submitted to the nociception protocols, this finding indicates that nociception is increased by NO production in *M. abbreviatus*. These findings are similar to those reported for *Cepae nemoralis* using L-NAME, in which there was an increase in avoidance behavior 15 minutes after L-NAME injection (Kavaliers et al., 1998). The results that we found using L-NAME are probably associated to the previously described hyperexcitability of dorsal horn neurons mediated by NO in vertebrates (Paul-Clark et al., 2001; Vetter et al., 2001), the increases of NOS levels in different animal pain models (Lou and Cizkova, 2000) and the tissue damage and consequent pain induced by NO (Levy and Zochodne, 2004; Calabrese et al., 2007).

One of the main findings of our study was the potentiation of morphine analgesia by NOS blockage. These results are similar those found in mammals, in which the inhibition of NO synthase enhances morphine and mu and delta opioid-mediated analgesia (Przewlocki et al., 1993; Kawabata et al., 1994; Machelska et al., 1997) and in disagreement with studies performed in humans and mice that demonstrated that co-administration of nitric oxide donors with opioids was beneficial in the treatment of pain (Lauretti et al., 2002; Sen et al., 2006; Hervera et al., 2009).

We also observed a clear pronociceptive effect of the NO-donor, SNP. Experiments using NO or NO-donors in mammals or human subjects have given conflicting results. Our results, obtained using *M. abbreviatus*, are in accordance with studies that have shown a hyperalgesic effect of NO and the fact that some hyperalgesic states involve a calcium-dependent production of NO which is responsible for increases in the intracellular concentration of cGMP that, in turn, induce allodynia (Boettger et al., 2007; Tang et al., 2007; Xu et al., 2007; Gomaa et al., 2009; Miyamoto et al., 2009). We believe that our findings and the similar results reported by other researchers are very reliable. However, we cannot ignore those studies that show a reduction in pain after NO release (Berrazueta et al., 1995; Pittrof et al., 1996; Lauretti et al., 1999). In fact, in snails NO presents a pronociceptive effect, this was earlier proposed in *Cepaea nemoralis* using thermal stimulus (Kavaliers et al., 1998) and confirmed in our study using both thermal and chemical stimulus.

The reduction of morphine analgesia induced by SNP that we found was similar to that previously described in rats (Machelska et al., 1997) and in *Cepaea nemoralis*

(Kavaliers et al., 1998). When we injected SNP and L-NAME after morphine administration, the pronociceptive effect of SNP was completely suppressed by the analgesic effects of morphine and L-NAME. This finding can be explained in several ways. One is that the endogenous NOS activity is more important than exogenous NO in the modulation of nociception. Another is that the NO released by SNP was already significantly reduced at the time the L-NAME was administered and therefore the predominant effect was a reduction in NO, in our point of view, the second hypothesis is more feasible.

In summary, the main contributions of our study using *M abbreviatus*, submitted to both thermal and chemical stimulus, were: 1- The analgesia induced by the NO blocker, L-NAME; 2- The potentiation of opioid analgesia using L-NAME, and 3- A clear demonstration of the pronociceptive effects of NO. We believe that the use of this animal model associated to other approaches, such as histochemistry for NADPH diaphorase and immunohistochemistry for NOS and other substances could be useful to solve some important questions that remain regarding the role of NO in nociception.

Acknowledgements: This work was supported by a FINEP research grant "Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN.Net)" # 01.06.0842-00, CNPq, PRONEX, CAPES, FAPERGS. M. Achaval is a CNPq investigator.

References

- 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 for nociceptive experiments: effects of morphine and naloxone on thermal avoidance behavior. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 73-80.
- Berrazueta, J.R., Losada, A., Poveda, J., Ochoteco, A., Riestra, A., Salas, E., Amado, J.A., 1995. Successful treatment of shoulder pain syndrome due to supraspinatus tendinitis with transdermal nitroglycerin. A double blind study. *Pain* 66, 63–67.
- Boettger, M.K., Uceyler, N., Zelenka, M., Schmitt, A., Reif, A., Chen, Y., Sommer, C., 2007. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur. J. Pain* 11, 810–818.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D.A., Stella, A.M.G., 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 766-775.
- Chase, R., 2002. Behavior and its neural control in Gastropod Molluscs. Oxford University Press, USA.
- Cristino, L., Guglielmotti, V., Cotugno, A., Musio, C., Santillo, S., 2008. Nitric oxide signaling pathways at neural level in invertebrates: Functional implications in cnidarians. *Brain Res.* 1225, 17-25.
- De Fraga, L.S., Da Silva, R.S., Achaval, M., Zancan, D.M., 2004. Carbohydrate metabolism in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* snail during anoxia exposure and post-anoxia recovery. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 301, 968-978.

Dos Santos, P.C., Gottfried, C., Gehlen, G., Gonçalves, C.A., Achaval, M., 2005. Distribution and ontogeny of glial fibrillary acidic protein in the snail *Megalobulimus abbreviatus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 141, 140-145.

Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M., 2004. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz J Med Biol Res.* 37, 1043-1053.

Faust, K., Gehrke, S., Yang, Y., Yang, L., Beal, M.F., Lu, B., 2009. Neuroprotective effects of compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties in a *Drosophila* model of Parkinson's disease. *BMC Neurosci.* 10, 109.

Feng, Z.P., Zhang, Z., van Kesteren, R.E., Straub, V.A., van Nierop, P., Jin, K., Nejatbakhsh, N., Goldberg, J.I., Spencer, G.E., Yeoman, M.S., Wildering, W., Coorssen, J.R., Croll, R.P., Buck, L.T., Syed, N.I., Smit, A.B., 2009. Transcriptome analysis of the central nervous system of the mollusk *Lymnaea stagnalis*. *BMC Genomics* 10, 451.

Gomaa, A.A., Elshenawy, M.M., Afifi, N.A., Mohammed, E.A., Thabit, R.H., 2009. Dual effect of nitric oxide donor on adjuvant arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 9, 439–447.

Gotow, T., Nishi, T., 2008. Simple photoreceptors in some invertebrates: Physiological properties of a new photosensory modality. *Brain Res.* 1225, 3-16.

Grinkevich, L.N., Lisachev, P.D., Kharchenko, O.A., Vasil'ev, G.V., 2008. Expression of MAP/ERK kinase cascade corresponds to the ability to develop food aversion in terrestrial snail at different stages of ontogenesis. *Brain Res.* 1187, 12-19.

Hervera, A., Leáñez, S., Negrete, R., Pol, O., 2009. The peripheral administration of a nitric oxide donor potentiates the local antinociceptive effects of a DOR agonist during chronic inflammatory pain in mice. *Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.* 380, 345–352.

Kalil-Gaspar, P., Marcuzzo, S., Rigon, P., Molina, C.G., Achaval, M., 2007. Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signaling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 148, 286-291.

Kandel, E.R., 1979. *Behavioral Biology of Aplysia*. USA, W.H Freeman Co. 463pp.

Kavaliers, M., 1992. Opioid systems, behavioral thermoregulation and shell polymorphism in the land snail *Cepaea nemoralis*. *J. Comp. Physiol. B* 162, 172-178.

Kavaliers, M., Choleris, E., Prato, F.S., Ossenkopp, K., 1998. Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail. *Brain Res.* 809, 50-57.

Kawabata, A., Manabe, S., Manabe, Y., Takagi, H., 1994. Effect of topical administration of L-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: A dual role of peripherally formed NO in pain modulation. *Br. J. Pharmacol.* 112, 547-550.

Lauretti, G.R., Lima, I.C.P.R., Reis, M.P., Prado, W.A., Pereira, N.L., 1999. Oral ketamine and transdermal nitroglycerin as analgesic adjuvants to oral morphine therapy for cancer pain management, *Anesthesiology* 90, 1528–1533.

Lauretti, G.R., Pérez, M.V., Reis, M.P., Pereira, N.L., 2002. Double-blinding evaluation of transdermal nitroglycerine as adjuvant to oral morphine for cancer pain management. *J. Clin. Anesth.* 14, 83-86.

Leáñez, S., Hervera, A., Pol, O., 2009. Peripheral antinociceptive effects of μ - and δ -opioid receptor agonists in NOS2 and NOS1 knockout mice during chronic inflammatory pain. *Eur. J. Pharmacol.* 602, 41–49.

Levy, D., Zochodne, D.W., 2004. NO pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Pract.* 4, 11-18.

Lou, D.Z., Cizkova, D.C., 2000. The role of Nitric Oxide in Nociception. *Curr. Rev. Pain* 4, 459-466.

Machelska, H., Labuz, D., Przewlocki, R., Przewlocka, B., 1997. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Enhances Antinociception Mediated by *Mu*, *Delta* and *Kappa* Opioid Receptors in Acute and Prolonged Pain in the Rat Spinal Cord. *Issue 2*, 977-984.

Malyshev, A.Y., Balaban, P.M., 1999. Synaptic facilitation in *Helix* neurons depends upon postsynaptic calcium and nitric oxide. *Neurosci. Lett.* 261, 65- 68.

Menéndez, L., Juárez, L., García, V., Hidalgo, A., Baamonde, A., 2007. Involvement of the nitric oxide in the inhibition of bone cancer-induced hyperalgesia through the activation of peripheral opioid receptors in mice. *Neuropharmacology* 53, 71–80.

Miclescu, A., Gordh, T., 2009. Nitric oxide and pain: ‘Something old, something new’. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 53, 1107–1120.

Miyamoto, T. Dubin, A.E., Petrus, M.J., Patapoutian, A., 2009. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. *PLoS One* 4, e7596.

Nóblega, H.G., Rigon, F., Stenert, C., Faccioni-Heuser, M.C., Achaval, M., 2006. Permeability of the haemolymph-neural interface in the terrestrial snail *Megalobulimus abbreviatus* (Gastropoda, Pulmonata): an ultrastructural approach. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 144, 119-24.

Paul-Clark, M.J., Gilroy, D.W., Willis, D., Willoughby, D.A., Tomlinson, A., 2001. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. *J. Immunol.* 166, 1169–77.

Pittrof, R., Lees, C., Thompson, C., Pickles, A., Martin, J.F., Campbell, S., 1996. Crossover study of glyceryl trinitrate patches for controlling pain in women with severe dysmenorrhoea. *Br. Med. J.* 312, 884.

Przewlocki, R., Machelska, H., Przewlocka, B., 1993. Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. *Life Sci.* 53, PL1-5.

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. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 107, 37-40.

Sen, S., Ugur, B., Aydin, O.N., Ogurlu, M., GURSOY, F., SAVK, O., 2006. The analgesic effect of nitroglycerin added to lidocaine on intravenous regional anesthesia. *Anesth. Analg.* 102, 916–920.

Swarowsky, A., Montero, 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. A Mol. Integr. Physiol.* 141, 230-238.

Szolcsányi, J., 2004. Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides* 38, 377-84.

Tang, Q., Svensson, C.I., Fitzsimmons, B., Webb, M., Yaksh, T.L., Hua, X.Y., 2007. Inhibition of spinal constitutive NOS-2 by 1400W attenuates tissue injury and inflammation-induced hyperalgesia and spinal p38 activation. *Eur. J. Neurosci.* 25, 2964–2972.

Van der Stelt, M., Di Marzo, V., 2004. Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur. J. Biochem.* 271, 1827-34.

Vetter, G., Geisslinger, G., Tegeder, I., 2001. Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92, 213-218.

Xie, M., Hermann, A., Kerschbaum, H.H., 2002. Complementary distribution of NADPH-diaphorase and l-arginine in the snail nervous system. *Cell Tiss. Res.* 307, 393-400.

Xu, L., Mabuchi, T., Katano, T., Matsumura, S., Okuda-Ashitaka, E., Sakimura, K., Mishina, M., Ito, S., 2007. Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. *Nitric Oxide* 17, 18–24.

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. Histol. Embryol.* 75,75-86.

Legends

Fig. 1 – Photograph showing *M. abbreviatus* displaying aversive behavior when submitted to noxious stimulus (thermal stimulus). HFc, head-foot complex; HP, hot plate.

Fig. 2 – *M. abbreviatus*' response latency to hot plate stimuli, 15 min after intrahemocelic injection of saline solution, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of L-NAME. Data are presented as mean \pm SD (***) corresponds to $p < 0.001$).

Fig. 3 – *M. abbreviatus*' response latency to hot plate stimuli, 15 min after intrahemocelic injection of saline solution, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of SNP. Data are presented as mean \pm SD (***) corresponds to $p < 0.001$).

Fig. 4 – *M. abbreviatus*' response latency to thermal stimulus, 15 min after different treatments. “a” corresponds to $P < 0.05$ when compared with control. “b” corresponds to $P < 0.05$ when compared with saline. “c” corresponds to $P < 0.05$ when compared with morphine. “d” corresponds to $P < 0.001$ when compared with L-NAME. “e” corresponds to $P < 0.05$ when compared with morphine plus L-NAME. “f” corresponds to $P < 0.001$ when compared with SNP. “g” corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine plus SNP.

Fig. 5 - *M. abbreviatus*' response latency to chemical stimulus, 15 min after different treatments. “a” corresponds to $P < 0.005$ when compared with control. “b” corresponds to $P < 0.005$ when compared with saline. “c” corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine. “d” corresponds to $P < 0.001$ when compared with L-NAME. “e” corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine plus L-NAME. “f” corresponds to $P < 0.005$ when compared with SNP. “g” corresponds to $P < 0.001$ when compared with morphine plus SNP.

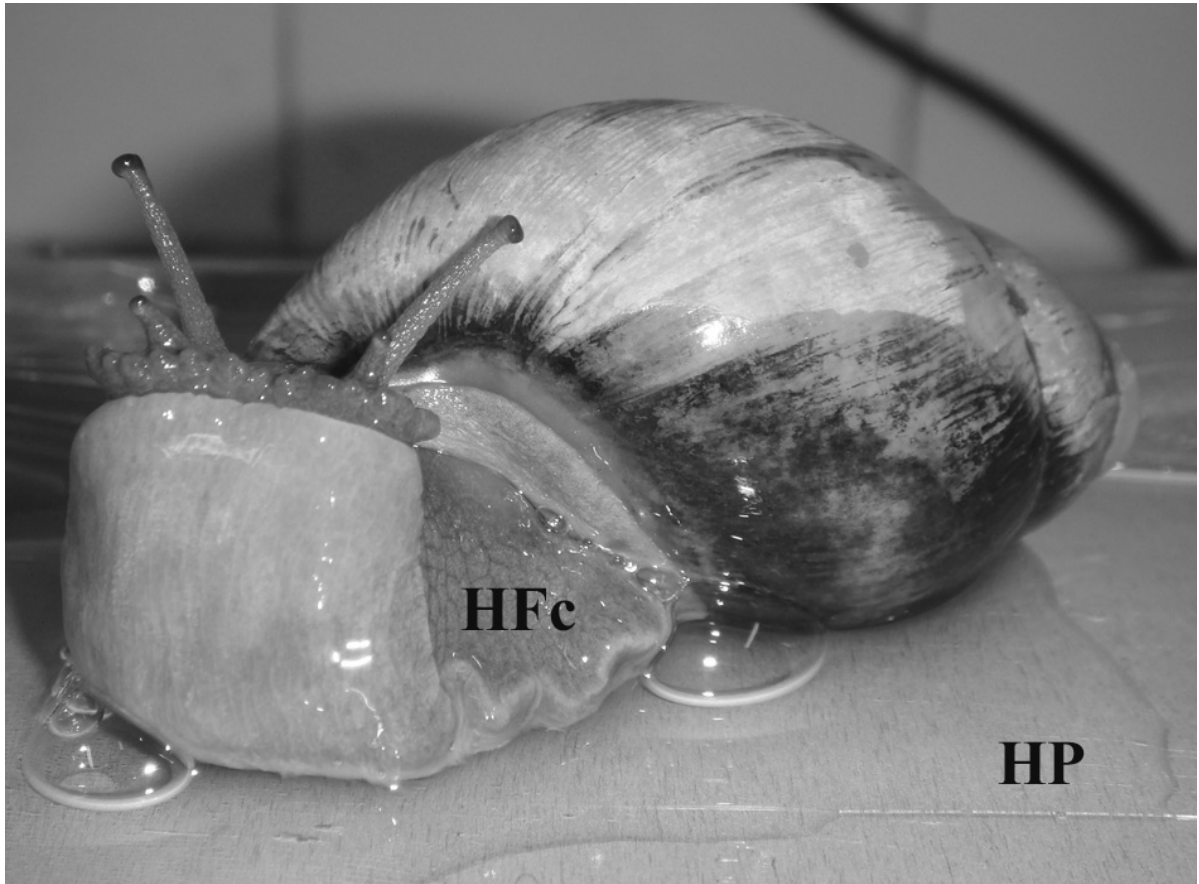
Figure 1

Figure 2

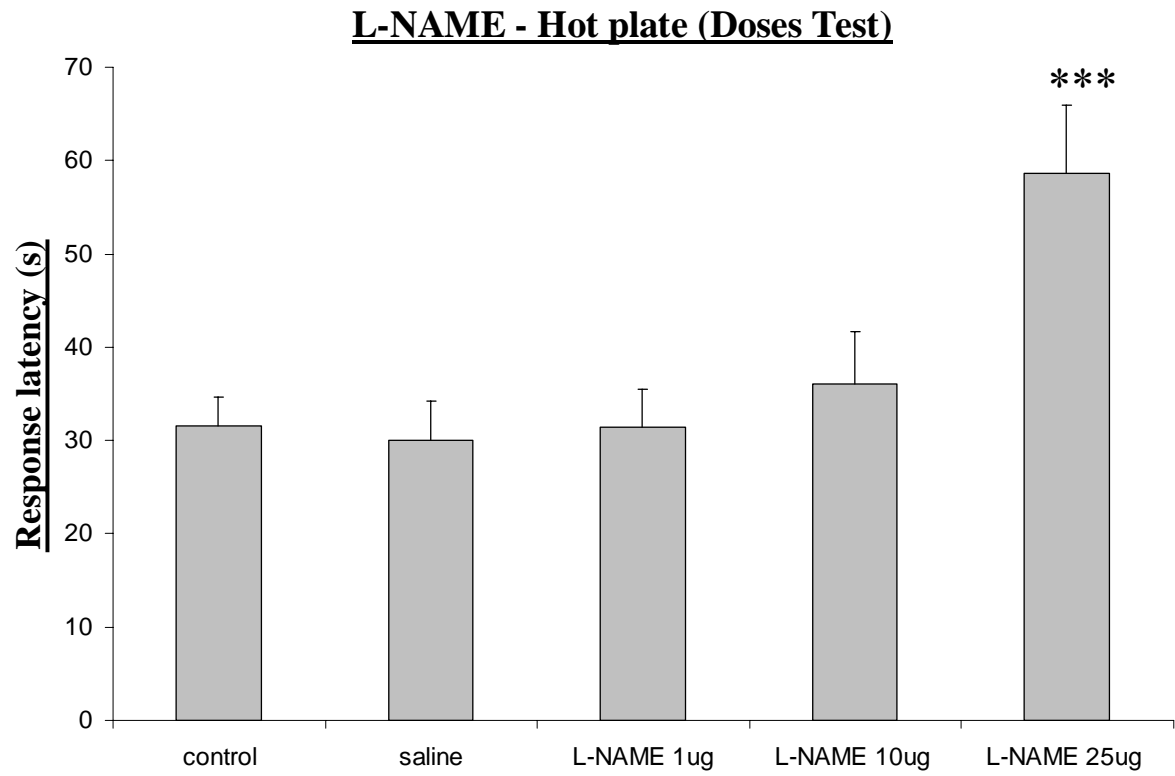


Figure 3

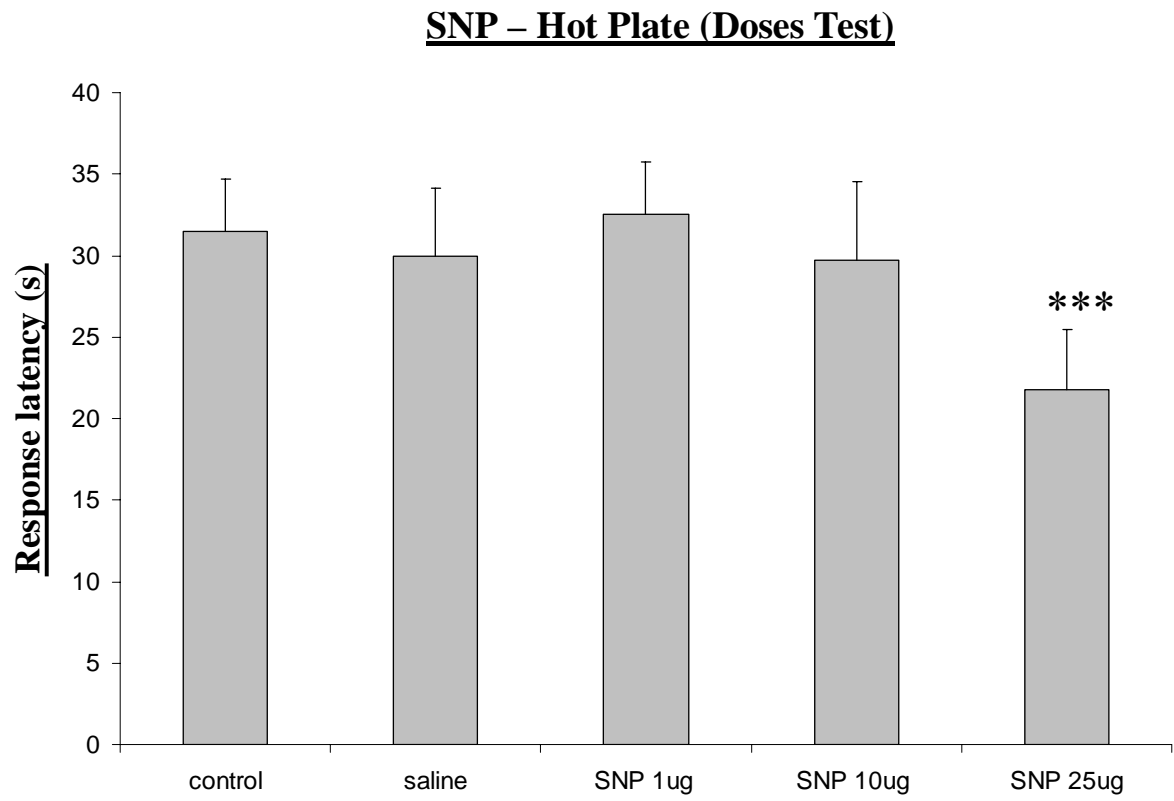


Figure 4

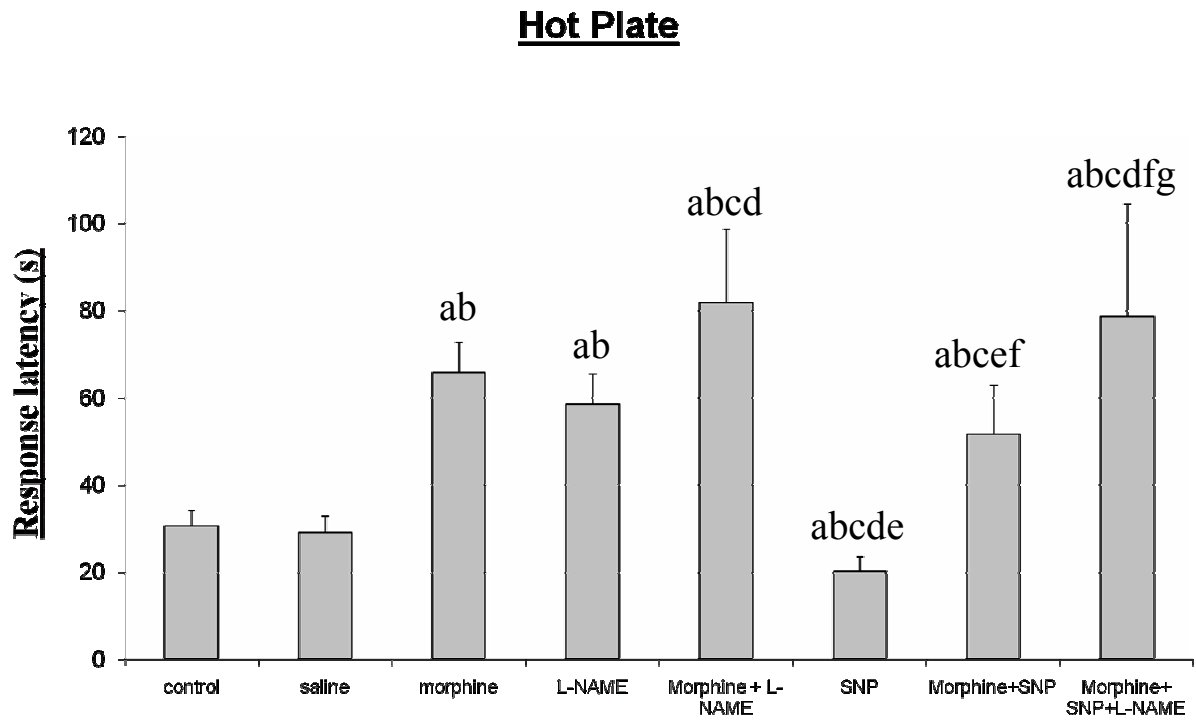
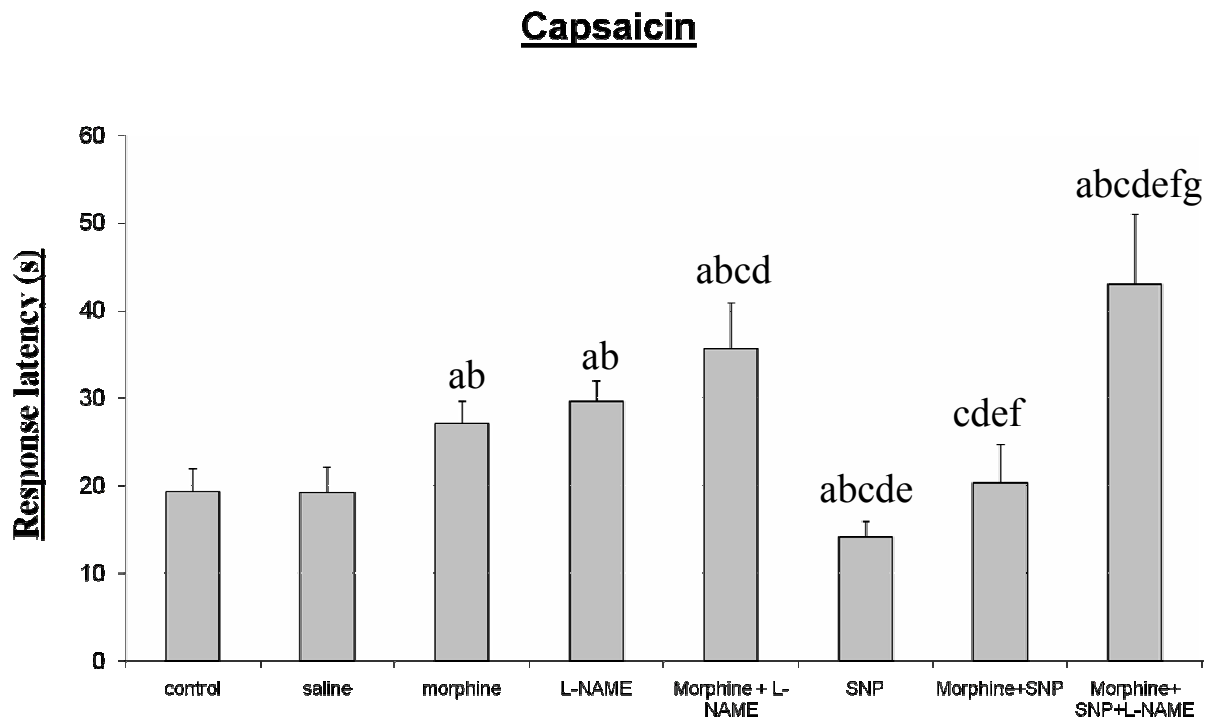


Figure 5



6. CONCLUSÕES

1. Os resultados do estudo histoquímico para detecção de possíveis neurônios produtores de NO no SN do caracol terrestre *M. abbreviatus* demonstraram a presença de populações neuronais positivamente marcadas pela técnica da NADPH-diaforase, um marcador para NOS, em todos os gânglios do SNC de caracóis jovens e adultos;
2. Em cada gânglio, muitos neurônios de diferentes tamanhos foram identificados, e entre estes neurônios positivos a intensidade de marcação foi diferenciada, sugerindo a presença de diferentes quantidades de NOS intracelular;
3. Fibras nervosas nos neuropilos dos gânglios, comissuras, conectivos interganglionares e nervos também apresentaram atividade enzimática, sugerindo a presença deste sistema nitrérgico também no sistema nervoso periférico de *M. abbreviatus* jovens e adultos;
4. Os processos neuropilares NADPH-d positivos observados na proximidade de todos os gânglios centrais sugere uma provável ação difusa do NO dentro de diferentes áreas do SNC deste modelo animal;
5. Fontes potenciais de NO no SNC de *M. abbreviatus* incluem grupos específicos de neurônios localizados principalmente nos gânglios cerebrais e pedais, por apresentarem um grande número de neurônios NADPH-d positivos;
6. Os neurônios NADPH-d positivos de tamanho médio encontrados nos gânglios cerebrais de animais jovens e adultos localizados no mesocérebro podem estar envolvidos com o comportamento alimentar e reprodutivo deste caracol, uma vez que apresentam

similaridade de localização e tamanho com grupos de neurônios envolvidos nestas atividades já descritos em outras espécies de moluscos. Além disso, o par de neurônios gigantes encontrados nesta mesma região dos gânglios cerebrais de animais jovens já foi descrito em *M. abbreviatus* por Zancan e cols. (1997) como sendo serotoninérgico, e também por localização similar com outros gastrópodos foi sugerido seu papel na modulação do comportamento alimentar em *M. abbreviatus*;

7. O neuropilo dos gânglios cerebrais de *M. abbreviatus*, bem como os nervos cerebrais, mostraram intensa marcação com NADPH-d, o que permite sugerir o envolvimento do NO no processamento de mecanismos sensoriais que ocorrem nos gânglios cerebrais de animais jovens e adultos;

8. Na região do pró-cérebro de animais jovens e adultos nenhum neurônio NADPH-s positivo foi encontrado, diferentemente do que acontece em outras espécies de gastrópodos. Sabe-se que esta região do gânglio está envolvida com a integração de informações olfatórias. Assim, é provável que em *M. abbreviatus* os neurônios envolvidos no circuito olfativo estejam localizados em outra região do gânglio cerebral ou em algum tecido periférico;

9. O par de neurônios gigantes NADPH-d positivos observado na região medial do gânglio pedal apresenta a mesma localização dos neurônios gigantes serotoninérgicos descritos em *M. abbreviatus* por Swarowsky e cols. (2005) e provavelmente corresponde ao neurônio Pd4 descrito em *Helix lucorum* por Balaban e cols. (2001), os quais mostram estar envolvidos no comportamento motor e na modulação do comportamento de retirada.

Assim, é provável que o NO esteja envolvido na resposta de retirada e na facilitação do comportamento de retirada na espécie estudada;

10. O semelhante padrão de marcação nas áreas neuropilares do gânglio pedal (NPA1 e NPA2) encontrado com as técnicas de NADPH-d por este estudo, e imunistoquímica para 5-HT por Swarowsky e cols. (2005), indica que a área NPA1, de onde emergem os nervos pedais anteriores, pode representar uma região de conexões e/ou projeções que se originam do pé do caracol, além de representar uma área para a integração de importantes informações para a integração do circuito motor, uma vez que recebe axônios de somas neuronais localizados em outras regiões ganglionares, possivelmente integrando funções do circuito de comportamento aversivo de *M. abbreviatus*. Desta forma, a distribuição de fibras NADPH-d positivas encontradas em animais jovens e adultos sugere que o NO esteja envolvido no comportamento motor;

11. A falta de neurônios NADPH-d positivos nos gânglios pleurais de animais jovens e sua presença em animais adultos pode indicar que os neurônios produtores de ON envolvidos em um determinado comportamento podem ser alterados durante o desenvolvimento de *M. abbreviatus*. Os neurônios encontrados nos gânglios pleurais de animais adultos estavam localizados em regiões que sugerem serem os mesmos também FMRFamidérgicos por Moriguchi-Jeckel (2001). Em outras espécies de gastrópodos, foi demonstrada uma interação anatômica e funcional de células nervosas liberadoras de NO e FMRFamida, sugerindo um papel regulatório da FMRFamida na sinalização mediada por NO no SNC de invertebrados. A distribuição similar de neurônios nitrérgicos e FMRFamidérgicos nos

gânglios pleurais de *M. abbreviatus* adultos sugere que esta regulação pode existir neste modelo animal;

12. A marcação neuronal nos gânglios pleurais de animais adultos e sua ausência em animais jovens pode explicar a ausência de marcação do par de neurônios gigantes do mesocérebro em animais adultos, verificada neste estudo. Como em *M. abbreviatus* adultos a atividade nitrérgica nos neurônios gigantes do mesocérebro parece retroceder, sua função pode ser substituída pelos neurônios pleurais NADPH-d positivos, observados apenas em adultos;

13. Os gânglios parietais e viscerais estão envolvidos na regulação de ambientes internos em gastropodos, controlando funções respiratórias e circulação da hemolinfa. Como a distribuição de neurônios NADPH-d positivos em animais jovens e adultos foi muito similar, tomando como base na sua localização semelhante em *Helix lucorum* (Zakharov et al., 1995), possivelmente o NO esteja envolvido no controle do coração e do trato gastrointestinal. O fato de que os neurônios do gânglio parietal direito são comandados pelo neurônio Pd4 localizado no gânglio pedal, também produtor de NO, reforça esta idéia;

14. Os neurônios positivos parietais grandes e gigantes encontrados em animais jovens e adultos, que representam o último estágio da integração da informação sensorial no SNC de moluscos, segundo Balaban (2002), reforçam a idéia do envolvimento do NO no comportamento motor;

15. Pode-se assumir a existência de um papel do NO mediando a comunicação entre neurônios e microglia no SNC de *M. abbreviatus* durante o desenvolvimento, uma vez que o trofospôncio que circunda o neurônio gigante do gânglio parietal esquerdo apenas aprece NADPH-d positivo em animais jovens;

16. A intensa atividade da NOS encontrada nos neurônios, neuropilo e nervos dos gânglios bucais de caracóis jovens e adultos indica que nestes animais o circuito alimentar pode também ser modulado por NO, semelhante ao que acontece em outros moluscos, uma vez que estes gânglios inervam a parede faríngeal, músculos, glândulas salivares, esôfago e estômago;

17. Analisando apenas os gânglios pedais de animais jovens e adultos submetidos a um estímulo térmico a 50°C, verificou-se que a área neuropilar 1 e os neurônios anteriores, mediais, laterais e posteriores apresentaram aumento na atividade nitrérgica, representada por uma densidade óptica significativamente maior nestas regiões em comparação com os grupos controle;

18. Certa homologia pode ser sugerida entre os neurônios anteriores NADPH-d positivos do gânglio pedal e alguns neurônios serotoninérgicos descritos em *M. abbreviatus*, apontando para o envolvimento do NO na resposta de retirada e na facilitação deste comportamento, uma vez que sua produção parece aumentar quando os animais recebem um estímulo nocivo;

19. A ação do NO no circuito nociceptivo de *M. abbreviatus* jovens e adultos parece acontecer também através dos grupos de neurônios laterais e posteriores dos gânglios pedais, uma vez que estas regiões apresentaram um significativo aumento na atividade da NADPH-d após estímulo térmico;

20. A área neuropilar 1 confirma seu envolvimento no circuito de nocicepção, contribuindo para a conclusão de que o NO parece ser um mediador químico envolvido neste processo, pois, à semelhança de estudos anteriores em *M. abbreviatus* com serotonina, esta região apresentou um aumento na atividade nitrérgica após estímulo térmico em animais jovens e adultos;

21. Em *M. abbreviatus*, pode ser proposta uma co-transmissão de serotonina e NO, uma vez que neurônios 5-HT_{1r} descritos nesta espécie são encontrados em localização similar aos neurônios NADPH-d positivos, podendo o NO regular o funcionamento do sistema serotoninérgico no SNC deste caracol, semelhante ao que ocorre em outras espécies de gastrópodos. Estes dados são reforçados pelo aumento na atividade da NADPH-d principalmente em 6h após o estímulo térmico, semelhante ao que foi descrito para a atividade serotoninérgica por Swarowsky e cols. (2005);

22. As diferenças encontradas na intensidade da NADPH-d entre grupos controle jovens e adultos pode sugerir que o NO seja necessário durante o desenvolvimento em *M. abbreviatus*, uma vez que em animais jovens esta atividade é mais intensa. Como ele se mantém maior em diferentes tempos de sobrevivência após o estímulo, também é possível

sugerir que o ON participe em processos sensoriais, semelhante a outras espécies de moluscos, onde ele está envolvido no crescimento axonal e na sinaptogênese;

23. Alterações nos níveis de NO promovem alterações no comportamento de retirada de *M. abbreviatus* submetido a estímulo térmico e químico, demonstrando uma provável ação do NO como agente pró-nociceptivo nesta espécie;

24. Inibidores da NOS, como o L-NAME, produzem um efeito antinociceptivo isolado representado por um significativo aumento na resposta de latência encontrada em animais submetidos a estímulo térmico e químico, indicando que a nocicepção é aumentada pela produção de NO em *M. abbreviatus*;

25. A inibição da produção de NO, por inibição da NOS, também promove uma potencialização da analgesia mediada por morfina nesta espécie, representada por um aumento na resposta de latência destes animais frente a estímulos térmico e químico, indicando uma possível ação do ON no sistema de opióides;

26. Doadores de NO apresentam um claro efeito pró-nociceptivo em *M. abbreviatus*, representado pela diminuição na resposta de latência destes animais quando submetidos aos estímulos térmico e químico;

27. A antinocicepção mediada por morfina é reduzida com a utilização de doadores de NO, reforçando o papel deste mediador químico como pró-nociceptivo em *M. abbreviatus*;

28. A atividade da NOS endógena parece ser mais importante do que o NO exógeno na modulação da nocicepção, uma vez que a administração de SNP após morfina e L-NAME não apresentou o efeito pró-nociceptivo registrado quando o mesmo foi administrado sem o bloqueador da NOS.

7. PERSPECTIVAS

1. Verificar o provável envolvimento do NO no sistema nervoso periférico de *M. abbreviatus*;
2. Investigar o papel da atividade nuclear do NO, uma vez que núcleos apresentaram NADPH-d positivos em neurônios de algumas regiões ganglionares;
3. Estudar a função do metacérebro de *M. abbreviatus*, identificando a função dos neurônios nitrérgicos presentes nesta região;
4. Identificar os grupos neuronais produtores de NO envolvidos no circuito olfatório da espécie estudada, uma vez que não foram localizados neurônios nitrérgicos no pró-cérebro;
5. Estabelecer o envolvimento dos grupos neuronais laterais e posteriores, produtores de NO, no circuito nociceptivo de *M. abbreviatus*, identificando se produzem outros mediadores químicos envolvidos na nocicepção.
6. Pesquisar as funções da área neuropilar 2, descrevendo o envolvimento do NO nestes possíveis processos;
7. Identificar a(s) via(s) através da(s) qual(is) o NO atua como agente pró-nociceptivo;
8. Descrever o envolvimento do NO na modulação do sistema de opióides em *M. abbreviatus*.

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, 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.
- BEESELEY, J.E., 1995. Histochemical methods for detecting nitric oxide synthase. *Histochem. J.*, 27: 757-769.
- BOGDANOV, M.B. & WURTMAN, R.J., 1997. Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett.*, 221: 197-201.
- BREDT, D.S., GLATT, C.E., HWANG, P.M., FOTUHI, M., DAWSON, T.M. & SNYDER, S.H., 1991. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron* 7: 615-624.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H., 1989. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 9030-9033.
- BREDT, D.S. & SNYDER, S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu. Rev. Biochem.*, 63: 175-195.

- BUDZIŃSKI, M., MISTEREK, K., GUMULKA, W. & DOROCIĄK, A., 2000. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in persistent pain. *Life Sci.*, 66: 301-305.
- BULLOCK, T.H. & HORRIDGE, G.A., 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates*. Vol 2. San Francisco, Freeman and Co.
- CALLSEN-CENCIC, P., HOHEISEL, U., KASKE, A., MENSE, S. & TENSCHERT, S., 1999. The controversy about spinal neuronal nitric oxide synthase: under which conditions is it up- or downregulation? *Cell Tissue Res.*, 295: 183-194.
- CARRILLO, B., PINOS, H., GUILLAMON, A., PANZICA, G. & COLLADO, P., 2007. Morphometrical and neurochemical changes in the anteroventral subdivision of the rat medial amygdala during estrous cycle. *Brain Res.*, 1150: 83-93.
- CATERINA, M.J., SCHUMACHER M.A., TOMINAGA, M., ROSEN, T.A., LEVINE, J.D. & JULIUS, D., 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824.
- CHASE, R., 2002. *Behavior and its neural control in Gastropod Molluscs*. Oxford University Press, USA.
- COOKE, I.R.C., EDWARDS, S.L. & ANDERSON, C.R., 1994. The distribution of NADPH diaphorase activity and immunoreactivity to nitric oxide synthase in the nervous system of the pulmonate mollusc *Helix aspersa*. *Cell Tissue Res.*, 277: 565-572.
- DI COSMO, A., DI CRISTO, C., PALUMBO, A., D'ISCHIA, M. & MESSENGER, J.B., 2000. Nitric oxide synthase (NOS) in the brain of the cephalopod *Sepia officinalis*. *J. Comp. Neurol.*, 428: 411-427.
- DOLAN, S., FIEL, L.C. & NOLAN, A.M., 2000. The role of nitric oxide and prostaglandin signaling pathways in spinal nociceptive processing in chronic inflammation. *Pain*, 86: 311-320.
- D'YAKONOVA, T.L., 2002. Interaction between serotonin and nitric oxide (NO) in the activation of the serotonergic system in the common snail. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 32: 275-282.

- 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.
- ELPHICK, M.R., KEMENES, G., STARAS, K. & O'SHEA, M., 1995. Behavioral role for nitric oxide in chemosensory activation of feeding in a mollusc. *J. Neurosci.*, 15: 7653-7664.
- 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. Monoamines in the pedal plexus of the land snail *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 37: 1043-1053.
- FICKBOHN, D.J., LYNN-BULLOCK, C.P., SPITZER, N., CALDWELL, H.K. & KATZ, P.S., 2001. Localization and quantification of 5-hidroxytryptophan and serotonin in central nervous system of *Tritonia* and *Aplysia*. *J. Comp. Neurol.*, 437: 91-105.
- FIORITO, G., 1986. Is there "pain" in invertebrates? *Behavioural Processes*, 12: 383-388.
- FLOREY, E. 1963. Acetylcholine in invertebrate nervous system. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 41: 2619-2626.
- GARTHWAITE, J. & BOULTON, C.L., 1995. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev. Physiol.*, 57: 683-706.
- GARTHWAITE, J., CHARLES, S.L. & CHESS-WILLIAMS, R., 1988. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336: 385-388.

- GELPERIN, A., 1994. Nitric oxide mediated network oscillations of olfactory interneurons in a terrestrial mollusc. *Nature*, 369: 61-63.
- GERSCHEFELD, H.M., 1973. Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. *Physiol. Rev.*, 53:1-119.
- GREEN, L.C., RUIZ DE LUZURIAGA, K., WAGNER, D.A., RAND, W., ISTFAN, N., YOUNG, V.R. & TANNENBAUM, S.R., 1981a., Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78: 7764-7768.
- GREEN, L.C., TANNENBAUM, S.R. & GOLDMAN, P., 1981b. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, 212: 56-58.
- HALEY, J.E., DICKENSON, A.H. & SCHACHTER, M., 1992. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. *Neuropharmacology*, 31: 251-258.
- 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.
- HIBBS, J.B., JR., TAINTOR, R.R. & VAVRIN, Z., 1987. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 235: 473-476.
- 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.
- HOHEISEL, U., UNGER, T. & MENSE, S., 2005. The possible role of the NO-cGMP pathway in nociception: different spinal and supraspinal action of enzyme blockers on rat dorsal horn neurones. *Pain*, 117: 358-367.
- HOPE, B.T. & VINCENT, S.R. 1989. Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 653-661.

- HUANG, S., KERSCHBAUM, H., ENGEL, E. & HERMANN, A., 1997. Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J. Neurochem.*, 69: 2516-2528.
- IGNARRO, L.J., BUGA, G.M., WOOD, K.S., BYRNS, R.E. & CHAUDHURI, G., 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 84: 9265-9269.
- JAFFREY, S.R. & SNYDER, S.H. 1995. Nitric oxide: a neural messenger. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11: 417-440.
- JULIUS, D. & BASBAUM, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-10.
- KALIL-GASPAR, P., MARCUZZO, S., RIGON, P., MOLINA, C.G. & ACHAVAL, M., 2007. Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda *Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signaling and opioid modulation in response to chemical noxious stimuli. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 148: 286-291.
- KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H. & JESSELL, T.M., 2000. *Principles of Neural Science*. New York, McGraw-Hill Co.
- KATZOFF, A., BEN-GEDALYA, T. & SUSSWEIN, A.J., 2002. Nitric oxide is necessary for multiple memory processes after learning that a food is inedible in *Aplysia*. *J. Neurosci.*, 22: 9581-9594.
- 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., 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., CHOLERIS, E., PRATO, F.S. & OSSENKOPP, K., 1998. Evidence for the involvement of nitric oxide and nitric oxide synthase in the modulation of opioid-induced antinociception and the inhibitory effects of exposure to 60-Hz magnetic fields in the land snail. *Brain Res.* 809: 50-57.
- KAVALIERS, M. & HIRST, M., 1984. The presence of an opioid system mediating behavioral thermoregulation in the terrestrial snail, *Cepaea nemoralis*. *Neuropharmacology*, 23: 1285-1289.
- KAVALIERS, M. & HIRST, M., 1986. Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in slug *Limax maximus*. *Life Sci.*, 38: 203-209.
- 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. & PERROT-SINAL, T.S., 1996. Pronociceptive effects of the neuropeptide nociceptin, in the land snail *Cepae nemoralis*. *Peptides*, 17: 763-8.
- KNOWLES, R.G. & MONCADA, S., 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.*, 298: 249-258.
- KNOWLES, R.G., PALACIOS, M., PALMER, R.M. & MONCADA, S., 1989. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 86: 5159-5162.
- KOBAYASHI, S., SADAMOTO, H., OGAWA, H., KITAMURA, Y., OKA, K., TANISHITA, K. & ITO, E., 2000. Nitric oxide generation around buccal ganglia accompanying feeding behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci. Res.*, 38: 27-34.
- 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.
- LIN, Q., PALECEK, J., PALECKOVÁ, V., PENG, Y.B., WU, J., CUI, M. & WILLIS, W.D., 1999. Nitric oxide mediates the central sensitization of primate spinothalamic tract neurons. *J. Neurophysiol.*, 81:1075-85.
- LOU, D.Z. & CIZKOVA, D.C., 2000. The role of Nitric Oxide in Nociception. *Curr. Rev. Pain*, 4: 459-466.
- MACHELSKA, H., LABUZ, D., PRZEWLOCKI, R. & PRZEWLOCKA, B., 1997. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Enhances Antinociception Mediated by *Mu*, *Delta* and *Kappa* Opioid Receptors in Acute and Prolonged Pain in the Rat Spinal Cord. *Issue*, 2: 977-984.
- MALYSHEV, A. & BALABAN, P.M., 1999. Synaptic facilitation in *Helix* neurons depends upon postsynaptic calcium and nitric oxide. *Neurosci. Lett.*, 261: 65- 68.
- MARLETTA, M.A., 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 268: 12231-12234.
- 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.
- MEULEMANS, A., MOTHET, J.P., SCHIRAR, A., FOSSIER, P., TAUC, L. & BAUX, G., 1995. A nitric oxide synthase activity is involved in the modulation of acetylcholine release in *Aplysia* ganglion neurons: a histological voltammetric and electrophysiological study. *Neuroscience*, 69: 985-995.
- MOROZ, L.L., CHEN, D., GILLETTE, M. & GILLETTE, R., 1996. Nitric oxide synthase activity in the molluscan CNS. *J. Neurochem.*, 66: 873-876.
- MOROZ, L.L. & GILLETTE, R., 1996. NADPH-diaphorase localization in the CNS and peripheral tissues of the predatory sea-slug *Pleurobranchaea californica*. *J. Comp. Neurol.*, 367: 607-622.

- MOROZ, L.L., NOREKIAN, T.P., PIRTLE, T.J., ROBERTSON, K.J. & SATTERLIE, R.A., 2000. Distribution of NADPH-diaphorase reactivity and effects of nitric oxide on feeding and locomotory circuitry in the pteropod mollusc, *Clione limacina*. *J. Comp. Neurol.*, 427: 274-284.
- MOROZ, L.L., PARK, J.H. & WINLOW, W., 1993. Nitric oxide activates buccal motor patterns in *Lymnaea stagnalis*. *Neuroreport*, 4: 643-646.
- MOROZ, L.L., WINLOW, W., TURNER, R.W., BULLOCH, A.G.M., LUKOWIAK, K. & SYED N.I., 1994. Nitric oxide synthase immunoreactive cells in CNS and periphery of *Lymnaea*. *Neuroreport*, 5: 1277-1280.
- NESTLER, E.J., HYMAN, S.E. & MALENKA, R.S., 2001. *Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience*. McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 539p.
- PALMER, R.M., FERRIGE, A.G. & MONCADA, S., 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-526.
- PALUMBO, A., 2005. Nitric oxide in marine invertebrates: a comparative perspective. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 142: 241-248.
- PANCHIN, Y.V., ARSHAVSKY, Y.I., DELIAGINA, T.G., ORLOVSKY, G.N., POPOVA, L.B. & SELVERSTON, A.I., 1996. Control of locomotion in the marine mollusc *Clione limacina*. XI. Effects of serotonin. *Exp Brain Res.*, 109: 361-365.
- PARTATA, W. A, KREPSY, A. M., XAVIER, L. L., MARQUES, M. & ACHAVAL, M., 1999. Distribution of glycogen phosphorylase and cutochrome oxidase in the central nervous system of the turtle *Thrachemys dorbigni*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 124: 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.

- PERUZZI, E., FONTANA, G. & SONETTI, D., 2004. Presence and role of nitric oxide in the central nervous of the freshwater snail *Planorbarius corneus*: possible implication in neuron-microglia communication. *Brain Res.*, 1005: 9-20.
- PROSSER, C.L., 1991. *Comparative animal Physiology. Neural and Integrative Animal Physiology*. New York, Wiley- Liss. 776pp.
- PRZEWLOCKI, R., MACHELSKA, H. & PRZEWLOCKA, B., 1993. Inhibition of nitric oxide synthase enhances morphine antinociception in the rat spinal cord. *Life Sci.*, 53: PL1-5.
- 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. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 107: 37-40.
- SADAMOTO, H., HATAKEYAMA, D., KOJIMA, S., FUJITO, Y. & ITO, E., 1998. Histochemical study on the relation between NO-generative neurons and central circuitry for feeding in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci. Res.*, 32:57-63.
- SANBERG, P. R., OSSENKOPP, K. & KAVALIERS, M., 1988. The behavioral Biology of Nociception: An Introduction to the symposium. *Brain Res. Bull.*, 21: 921-922.
- SCHARRER, B., 1987. Neurosecretion: beginnings and new directions in neuropeptide reseach. *Ann. Ver. Neurosci.*,10: 1-17.
- SMITH, J.A., 1991. A Question of Pain in Invertebrates. In: *ILAR Journal Online*. Disponível em : http://dels.nas.edu?ilar_n/ilarjournal/33_1_2Question.shtml.
- SOUZA, A.M. & PRADO, W.A., 2001. The dual effect of a nitric oxide donor in nociception. *Brain Res.*, 897, 9-19.
- STEFANO, G.B. & OTTAVIANI, E., 2002. The biochemical substrate of nitric oxide signaling is present in primitive non-cognitive organisms. *Brain Res.*, 924: 82-89.
- STRAUB, V.A., GRANT, J., O'SHEA, M. & BENJAMIN, P.R., 2007. Modulation of serotonergic neurotransmission by nitric oxide. *J. Neurophysiol.*, 97: 1088-1099.

- STUEHR, D.J., GROSS, S.S., SAKUMA, I., LEVI, R. & NATHAN, C.F., 1989. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.*, 169: 1011-1020.
- 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. A Mol. Integr. Physiol.*, 141: 230-238.
- TEYKE, T., 1996. Nitric oxide, but not serotonin, is involved in acquisition of food-attraction conditioning in the snail *Helix pomatia*. *Neurosci. Lett.*, 206: 29-32.
- TIERNEY, A.J., 2001. Structure and function of invertebrates 5-HT receptors: a review. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 128: 791-804.
- VALTSCHANOFF, J.G., WEINBERG, R.J., RUSTIONI, A. & SCHMIDT, H.H., 1992. Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord. *Neurosci. Lett.*, 148: 6-10.
- VASCHENKO, M.A. & KOTSYUBA, E.P., 2008. NADPH-diaphorase activity in the central nervous system of the Gray mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker) under stress conditions: a histochemical study. *Mar. Environ. Res.*, 66: 249-258.
- VETTER, G., GEISSLINGER, G. & TEGEDER, I., 2001. Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain*, 92: 213-218.
- VINCENT, S.R., 1994. Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.*, 42: 129-160.
- VIOLA, G.G., RODRIGUES, L., AMERICO, J.C., HANSEL, G., VARGAS, R.S., BIASIBETTI, R., SWAROWSKY, A., GONÇALVES, C.A., XAVIER, L.L., ACHAVAL, M., SOUZA, D.O. & AMARAL, O.B., 2009. Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Res.*, 1274: 47-54.

- WALCOURT-AMBAKEDEREMO, A. & WINLOW, W., 1994. 5-HT receptors on identified Lymnaea neurons in culture: pharmacological characterization of 5-HT₂ 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. A Mol. Integr. Physiol.*, 93: 25-39.
- WALTERS, E.T., 1987. Multiply sensory neurons correlates of site-specific sensitization. *J. Neurosci.*, 7: 408-417.
- WALTERS, E.T. & ERICKSON, M.T., 1986. Directional control and the functional organization of defensive responses in *Aplysia*. *J. Comp. Physiol. A*, 159: 339-351.
- XAVIER, L.L., VIOLA, G.G., FERRAZ, A.C., DA CUNHA, C., DEONIZIO, J.M., NETTO, C.A. & ACHAVAL, M., 2005. A simple and fast densitometric method for the analysis of tyroxine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Protoc.*, 16: 58-64.
- XIE, M., HERMANN, A. & KERSCHBAUM, H.H., 2002. Complementary distribution of NADPH-diaphorase and l-arginine in the snail nervous system. *Cell Tissue Res.*, 307: 393-400.
- ZAKARIA, Z.A., SULAIMAN, M.R., SOMCHIT, M.N., JAIS, A.M. & ALI, D.I., 2005. The effects of L-arginine, D-arginine, L-name and methylene blue on *channa striatus*-induced peripheral antinociception in mice. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 8: 199-206.
- 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. A Mol. Integr. Physiol.*, 118: 765-772.

ZANCAN, D.M., NÓBLEGA, H.G., SEVERINO, A.G. & ACHAVAL, M., 1994. Acetylcholinesterase distribution in the central nervous system of the *Megalobulimus oblongus* (Gastropoda, Pulmonata). *Arch. Anat. Hist. Embr. Norm. Exp.*, 75: 75-86.

ZHUO, M., MELLER, S.T. & GEBHART, G.F., 1993. Endogenous nitric oxide is required for tonic cholinergic inhibition of spinal mechanical transmission. *Pain*, 54: 71-78.

