



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

COMPORTAMENTO AVERSIVO NO CARACOL *MEGALOBULIMUS*  
*ABBREVIATUS*: EVIDÊNCIAS DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 E  
MODULAÇÃO OPIÓIDE EM RESPOSTA A ESTÍMULOS NOCIVOS

**Pedro Ivo Kalil-Gaspar**

Porto Alegre

2007



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

**COMPORTAMENTO AVERSIVO NO CARACOL *MEGALOBULIMUS*  
*ABBREVIATUS*: EVIDÊNCIAS DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR TRPV1 E  
MODULAÇÃO OPIÓIDE EM RESPOSTA A ESTÍMULOS NOCIVOS**

**Pedro Ivo Kalil-Gaspar**

**Orientadora:** Profa. Dra. Matilde Achaval Elena

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Neurociências.

Porto Alegre

2007

## ÍNDICE

Lista de abreviaturas e figuras.....	04
Resumo.....	06
Introdução.....	08
Objetivos.....	22
Artigo.....	23
Conclusões e perspectivas.....	43
Referências bibliográficas.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATPase – adenosina trifosfatase

ARD – domínio de repetição de anquirina

OCR – *osmoreceptor-9 and capsaicin-related*

PKC – proteinocinase C

PLA2 – fosfolipase A2

SNC – sistema nervoso central

TRPA – *transient receptor potential – ankyrin*

TRPC – *transient receptor potential – canonical*

TRPM – *transient receptor potential – melastatin*

TRPML – *transient receptor potential – mucolipin*

TRPN– *transient receptor potential – (NON-mechano-potential)*

TRPP – *transient receptor potential – polycystin*

TRPV – *transient receptor potential – vanilloid*

## FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - A árvore filogenética dos canais TRP.....	09
Figura 2 - Modelo topológico da estrutura do receptor TRPV.....	10
Figura 3 - Ligantes endógenos do receptor TRPV em vertebrados.....	13
Figura 4 - Representação esquemática do caracol <i>Megalobulimus abbreviatus</i> na primeira fase do comportamento aversivo sobre placa aquecida a temperatura nociva.....	17
Figura 5 Representação esquemática do caracol <i>Megalobulimus abbreviatus</i> na segunda fase do comportamento aversivo sobre placa aquecida a temperatura nociva.....	17
Figura 6 - Representação esquemática do circuito de retirada proposto para <i>Helix lucorum</i> .....	19

### ARTIGO

Figura 1 – Respostas à capsaicina em concentrações de 0,1% e 0,5%.....	40
Figura 2 - Respostas à capsaicina 0,5% após injeção de vermelho de rutênio.....	40
Figura 3 - Respostas ao calor após injeção de vermelho de rutênio.....	41
Figura 4 - Respostas à capsaicina 0,5% após injeção de capsazepina.....	41
Figura 5 - Respostas ao calor após injeção de capsazepina.....	42
Figura 6 – Respostas à capsaicina 0,5% após injeção de morfina, naloxone, e naloxone mais morfina.....	42

## RESUMO

O receptor da capsaicina TRPV1 (*transient receptor potential channel – vanilloid 1*) é um canal de cátions não-seletivo que promove o influxo de cálcio em neurônios, quando ativado por estímulos nocivos. O caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus* apresenta comportamento aversivo, elevando seu complexo cabeça-pé quando colocado sobre substratos nocivos, e serve como um modelo simples e útil em experimentos de nocicepção. O objetivo deste estudo foi medir a resposta nociceptiva (latência aversiva) do *M. abbreviatus* após exposição à capsaicina tópica (soluções aquosas a 0,1% e 0,5%), e compará-la àquelas obtidas em um modelo prévio de estímulo térmico nocivo (50°C). Foi também testado se o vermelho de rutênio (doses de 3 mg/kg e 6 mg/kg, 5 min antes da exposição) e a capsazepina (doses de 1 mg/kg e 3 mg/kg, 5 min antes da exposição), respectivamente antagonistas inespecífico e específico do receptor vanilóide 1, poderiam modificar tanto as respostas evocadas pela capsaicina quanto aquelas obtidas com estímulo térmico aversivo. Finalmente, os animais foram injetados com salina, morfina (20 mg/kg), naloxone (5 mg/kg) ou morfina mais naloxone, 15 min antes da exposição à capsaicina 0.5%. As latências foram medidas quando o animal elevava seu complexo cabeça-pé a 1 cm do substrato. Os dados foram comparados por análise de variância de uma via (ANOVA) e teste *post hoc* de mínima diferença significativa (LSD), e por teste T de Student ( $p < 0,05$ ), em *software* SPSS 7.0. Resultados (média +/- EMP): a capsaicina tópica provocou comportamento de retirada intenso de forma dose-dependente (25.4 +/-

2.0 s, 15.3 +/- 1.9 s e 9.1 +/- 1.0 s para veículo, capsaicina a 0.1% e a 0.5%, respectivamente). A capsazepina inibiu significativamente a resposta à capsaicina (19.2 +/- 1.8 s para concentração de 1 mg/kg; 5.3 +/- 0.4 s para o veículo), e a resposta ao calor nocivo (28.1 +/- 1.8 s, 48.8 +/- 3.6 s, 20.4 +/- 1.2 s para concentrações de 1 mg/kg, 3 mg/kg e veículo, respectivamente). O vermelho de rutênio (6 mg/kg and 3 mg/kg, respectivamente) atenuou tanto as respostas de retirada à capsaicina (23.1 +/- 1.9 s) e ao calor (55.4 +/- 6.5 s) , quando comparadas ao veículo (16.8 +/- 2.6 s e 33.9 +/- 6.4 s, respectivamente). A morfina aumentou as latências induzidas pela capsaicina (26.5 +/- 3.4 s). O naloxone, tanto sozinho (8.1 +/- 1.1 s) quanto em combinação com a morfina (8.7 +/- 1.3 s), diminuiu marcadamente as latências provocadas pela capsaicina quando comparado à morfina apenas, ou à salina (18.2 +/- 2.6 s). Estes resultados indicam que o receptor TRPV1 desempenha um papel no comportamento aversivo do *M. abbreviatus* e evidencia um mecanismo regulado por opióides nas respostas induzidas pela capsaicina.

## Introdução

O íon cálcio desempenha funções críticas na fisiologia celular, incluindo a expressão gênica, a proliferação, a secreção, e morfologia. As concentrações de íons cálcio nos diferentes compartimentos intracelulares dependem de precisa regulação. Em geral, o aumento do íon no citoplasma decorre tanto da sua liberação por locais de estoque (principalmente dos retículos endoplasmático e sarcoplasmático, através de canais ativados por inositol trifosfato ou de receptores rianodínicos), como do influxo de íons cálcio através da membrana plasmática, oriundos do meio extracelular, por meio de canais ativados e/ou regulados por uma diversidade de elementos. A remoção de íons cálcio do citoplasma ocorre pelo seu transporte para dentro do retículo endoplasmático por bombas de cálcio-*ATPases* ou por mecanismos de simporte ou antiporte com outros íons, especialmente o sódio (Carafoli, 2002).

A descoberta de uma nova classe de canais de cálcio, a Superfamília de Receptores *Transient Receptor Potential* (TRP) permitiu um maior entendimento dos mecanismos de influxo de cálcio em uma grande variedade de células. Canais TRP são expressos em células excitáveis e não excitáveis, tanto em vertebrados quanto invertebrados, e representam vias primárias de entrada do íon. O primeiro receptor TRP foi identificado como um componente central do complexo de fototransdução da mosca drosófila (Cosens *et al.*, 1969; Cosens, 1971; Hardie *et al.*, 1992). A subsequente descoberta de homólogos em mamíferos e nematódeos levou à identificação de mais de 25 canais (Figura 1), que apresentam homologia



com os genes *Nan* presentes na drosófila, e com as proteínas OCR (*Osmoreceptor-9 and capsaicin receptor-related*) do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Atualmente, os receptores TRP são agrupados nas seguintes subfamílias principais: TRPCs (clássicos, ou canônicos), TRPVs (vanilóides), TRPMs (melastatínicos), TRPPs (policistínicos - referentes à proteína da doença do rim policístico tipo 2), TRPMLs (mucolipínicos), TRPAs (anquirínicos) e TRPNs (*NOMP: no-mechano-potential*; O'Neil *et al.*, 2003; Nilius *et al.*, 2005; Clapham *et al.*, 2005; Minke, 2006).

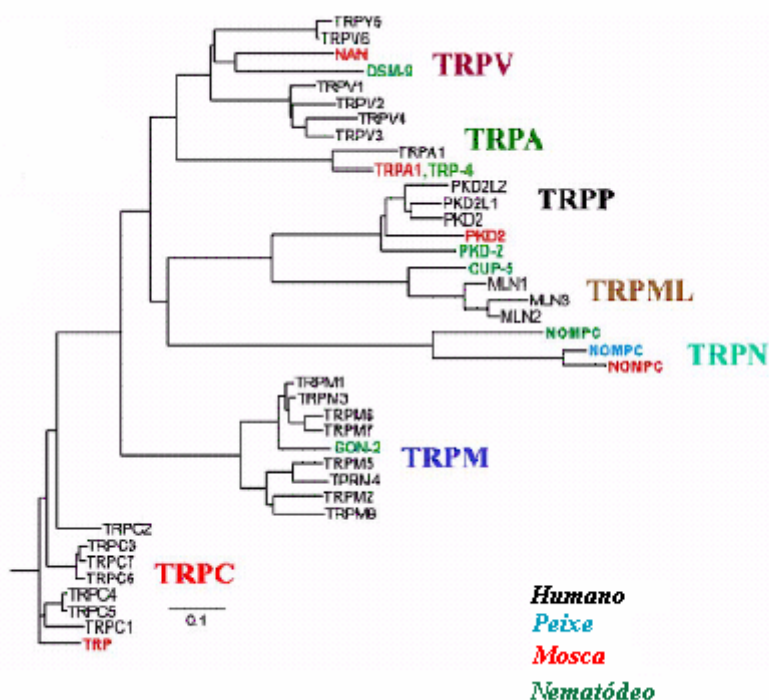


Figura 1. A árvore filogenética dos canais TRP. A figura mostra as sete subfamílias que constituem a família TRP. As quatro diferentes espécies são indicadas em diferentes cores. Apenas alguns membros da Drosófila e *C. elegans* são incluídos (adaptado de Nilius *et al.*, 2005)

Devido às suas propriedades na transdução de estímulos sensoriais e não sensoriais, a subfamília TRPV (1 a 6) tem recebido uma crescente atenção. Os

membros neste grupo apresentam sensibilidades a diversos estímulos ambientais, nocivos ou não, incluindo pimentas e outros derivados vegetais, mediadores inflamatórios, calor, prótons, estímulos osmo- e mecano-sensoriais. Os canais TRPVs, como os outros TRPs, são heterotetrâmeros cujas subunidades caracterizam-se por 6 domínios transmembranares e longas terminações COOH e NH<sub>2</sub>. Um curto segmento hidrofóbico entre os domínios transmembranares 5 e 6 dá origem a uma alça de poro (Figura 2). A terminação NH<sub>2</sub> contém 2 a 5 domínios de repetição de anquirina, considerados sítios potenciais de interações protéicas, e também vários sítios potenciais de fosforilação pelas proteína-cinases C e A (Caterina *et al.*, 1997; Caterina *et al.*, 2001; Szolcsányi, 2004; Ferrer-Montiel *et al.*, 2004; Rosebaum *et al.*, 2004). Os canais TRPV apresentam uma seletividade variada ao cálcio. Apesar da maioria dos membros serem apenas modestamente mais seletivos ao cálcio que a outros ânions monovalentes, dois membros (TRPV5 e TRPV6) possuem poros altamente seletivos ao íon cálcio (Hoenderop *et al.*, 2005; Nijenhuis *et al.*, 2005).

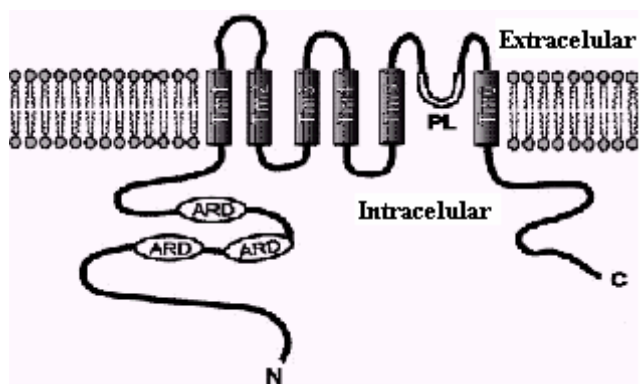


Figura 2. Modelo topológico da estrutura do receptor TRPV. Propõe-se que o canal possua 6 domínios transmembranares (TM1-6), uma alça de poro (PL), e longas caudas NH<sub>2</sub> e COOH, ambas citoplasmáticas. A terminação NH<sub>2</sub> possui 2 a 5 domínios de repetição de anquirina (ARD; adaptado de O'Neil *et al.*, 2003).

A capsaicina, o princípio ardente da pimenta vermelha do gênero *capsicum*, é um irritante natural, como o olvanil, o eugenol e a resiniferatoxina (coletivamente denominados vanilóides), que provoca dor ativando receptores específicos em terminações nervosas. A descoberta da capsaicina como ativador de fibras nociceptivas através de um receptor específico precedeu por décadas à sua posterior classificação como um receptor TRP (Szolcsányi, 2004; Xu *et al.*, 2006). Compostos vanilóides vêm sendo usados há muitos anos em estudos com neuropeptídeos e na terapêutica de distúrbios dolorosos (principalmente na neuralgia pós-herpética e artrite reumatóide, em aplicações tópicas, com efeitos discretos).

A despolarização de nociceptores polimodais C em mamíferos, por influxo de cálcio através de canais vanilóides, causa a liberação neuronal periférica de substância P e outros neuropeptídeos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, a somatostatina e o peptídeo intestinal vasoativo (Kalil-Gaspar, 2003; Stander *et al.*, 2004; Steinhoff *et al.*, 2003). O alvo molecular específico da capsaicina, o receptor TRPV1 (*transient receptor potential channel - vanilloid 1*) foi classificado como um TRP após sua clonagem e caracterização funcional (Caterina *et al.*, 1997). Constitui-se em um canal de cátions não-seletivo, presente em neurônios de vertebrados e invertebrados, que promove o influxo de cálcio quando ativado por vanilóides ou por estímulos nocivos, como temperaturas maiores que 43°C, aumento da concentração de prótons (pH<6,5), e derivados de lipídeos como alguns produtos a jusante (*downstream*) da ação da lipoxigenase sobre o ácido araquidônico, N-oleoildopamina e o endocanabinóide anandamida

(Jancsó *et al.*, 1967; Caterina *et al.*, 1997; O'Neil *et al.*, 2003; Van der Stelt *et al.*, 2004; Nilius *et al.*, 2005).

Em mamíferos, o canal TRPV1 funciona como um receptor primário para estímulos nocivos, apesar de outras funções poderem existir. O TRPV1 é fortemente expresso em neurônios sensoriais, incluindo aqueles nos gânglios da raiz dorsal e trigeminais, com expressão moderada em fibras nervosas de outros tecidos, como pâncreas, encéfalo, fígado, bexiga, pele, vísceras e outros. Um aspecto importante do funcionamento do TRPV1 é a sua sensibilização por um ou mais estímulos e/ou por compostos endógenos. A exposição de células que expressam TRPV1 a um meio ácido sensibiliza o receptor à ativação por calor, reduzindo seu limiar. Do mesmo modo, prótons sensibilizam o receptor aos efeitos da capsaicina. Alternativamente, a capsaicina e ativadores da fosfolipase C-beta em via PKC-dependente (aceto-miristato de éster de forbol, e bradicinina) diminuem o limiar de ativação por íons H<sup>+</sup>. Tais eventos podem explicar a hiperalgesia induzida por inflamação, em que prótons e bradicinina liberados pelo tecido inflamado ativariam o TRPV1 e levariam à hipersensibilidade regional (Caterina *et al.*, 2001; Julius *et al.*, 2001; Chuang *et al.*, 2001; O'Neil *et al.*, 2003).

Apesar de sua presença no SNC de mamíferos, o TRPV1, sob condições normais fisiológicas, dificilmente é ativado por pH baixo ou calor, o que sugere uma regulação preferencial por ligantes endógenos, os chamados endovanilóides. Este grupo compreende três compostos identificados até o momento, todos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (liberado de lipídeos de membrana por ação da fosfolipase A2). São eles (Figura 3) o endocanabinóide anandamida (que possui dois receptores próprios CB1 e CB2, ligados à proteína G

e que não se ligam a vanilóides), a N-araquidonoildopamina e produtos da lipoxigenase (15-HPETE e 12-HPETE). Tais compostos apresentam similaridades estruturais entre si e com a capsaicina, e funcionam como neurotransmissores atípicos lipossolúveis, que podem ser liberados tanto por células não neuronais (por exemplo, na lesão de tecidos periféricos), quanto por ação da fosfolipase A2 (PLA2) no SNC. A forma lipossolúvel dos derivados de ácidos graxos de membrana permite a difusão sináptica retrógrada ou anterógrada, além de sinalização parácrina ou autócrina. A extensão de seus efeitos é estritamente dependente da complexidade do microambiente celular em que são liberados (Van der Stelt *et al.*, 2004; Minke, 2006).

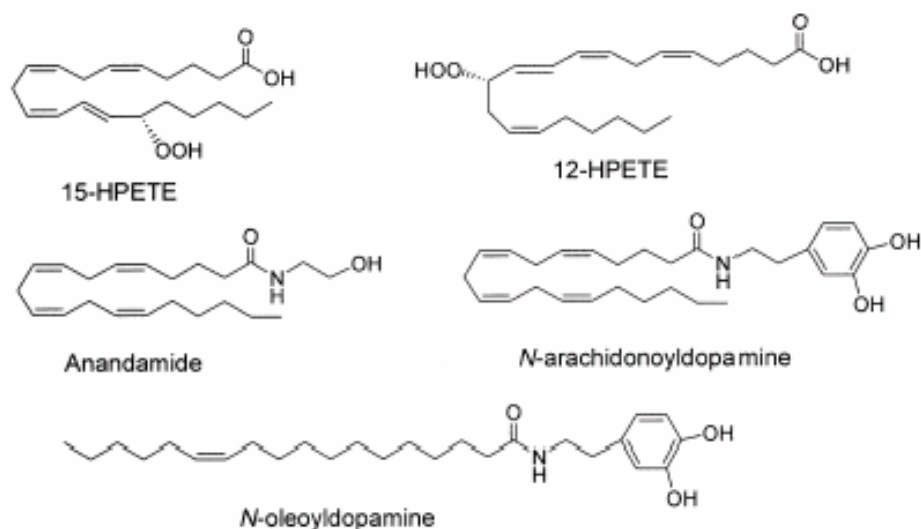


Figura 3. Ligantes endógenos do receptor TRPV em vertebrados (adaptado de Van der Stelt *et al.*, 2004).

Outros três canais vanilóides, TRPV2, TRPV3, e TRPV4, também são abertos por calor em diferentes faixas de temperatura (>53°C, >31-39°C e >25-33°C, respectivamente). Em mamíferos, os TRPVs 1 a 3 são vastamente

expressos em gânglios das raízes dorsais e trigeminais, enquanto TRPV3 e 4 são expressos em queratinócitos na pele (i.e., células não neurais), favorecendo a concepção de que estes quatro receptores possuam um papel integrador na sensação térmica. Além disto, estes receptores desempenham muitas outras funções em células excitáveis e não excitáveis, como a osmorrecepção e mecanorrecepção, em resposta a uma variedade de estímulos. O TRPV4 é fortemente expresso nos rins e células epiteliais da traquéia, e nas células osmosensoriais dos órgãos circunventriculares, no hipotálamo, nas células cocleares pilosas mecanossensoriais, nas células de Merkel do complexo de vibrissas, em células endoteliais, além de exibir pequena expressão em muitos outros órgãos do trato gastrointestinal. Como foi dito, os últimos dois membros da família vanilóide, TRPV5 e 6, são altamente seletivos ao cálcio e apresentam expressão principalmente em células epiteliais, incluindo todo o trato gastrointestinal, próstata, mamas e glândulas sudoríparas, e parecem estar envolvidos na reabsorção de cálcio nas membranas apicais dos epitélios (Nilius *et al.*, 2005; Minke, 2006).

A nocicepção é definida como “sensação produzida por dano tecidual ou por estímulo de intensidade potencialmente lesiva, que gera comportamentos visando à proteção dos tecidos lesados, como reflexos de retirada ou fuga”. (Kavaliers, 1988). Constitui-se uma característica básica dos animais, implicando a presença de vias anatômicas aferentes nociceptoras e vias eferentes motoras. A dor, no entanto, é uma experiência perceptual complexa, definida como “uma experiência sensorial aversiva causada por uma injúria potencial ou real que provoca reações vegetativas e motoras protetoras, resultando em aversão

aprendida, e pode modificar comportamentos específicos da espécie, incluindo o comportamento social". 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 (Sanberg *et al.*, 1988; Kavaliers, 1988).

O sistema nervoso mais sofisticado dos moluscos é aquele encontrado nos cefalópodes (ex. *Octopus vulgaris*), que exibem vias e tratos de "dor" em seu SNC. Apesar de exibirem sistemas neurais menos complexos que os cefalópodes, moluscos de outras classes também são considerados capazes de apresentar respostas nociceptivas. O comportamento aversivo dos moluscos a estímulos táteis e térmicos nocivos é um conjunto de fenômenos de comportamento defensivo e resposta nociceptiva bem descritos. Gastrópodes como *Cepaea nemoralis*, *Megalobulimus sanctipauli*, *Megalobulimus abbreviatus* e *Aplysia californica* respondem a estímulos nocivos com uma reação de retirada acompanhada de secreção de muco. Quando colocados sobre substratos aquecidos, *C. nemoralis* (40°C), *M. sanctipauli* (52°C) e *M. abbreviatus* (50°C) mostram comportamento aversivo dentro de poucos segundos, caracterizado por elevação das regiões anteriores do complexo cabeça-pé (C-P). Este comportamento não é detectado em caracóis à temperatura ambiente ou a temperaturas mais baixas, como a 30-33°C (Romero *et al.*, 1994; Walters *et al.*, 1987; Hirst *et al.*, 1987; Balaban, 2002; Achaval *et al.*, 2005).

Sobre uma placa aquecida a 22°C (estímulo não nocivo), *M. abbreviatus* apresenta somente o comportamento denominado exploratório (complexo cabeça-pé estendido sobre substrato, com movimentos ondulatórios lentos da região

parapodial, e palpos labiais e tentáculos protraídos em exploração do ambiente). Nestas condições, o caracol apresenta discreta elevação da região anterior, sem atividade locomotora proeminente, produção de muco ou rotação da concha. Ao contrário, quando colocado sobre substrato aquecido nocivo (50°C), o *M. abbreviatus* apresenta um comportamento aversivo estereotípico de duas fases: assim que deixado sobre a chapa aquecida, imediatamente recolhe discretamente o corpo para dentro da concha enquanto retrai tentáculos orais e palpos labiais, erguendo os bordos laterais do pé. Em movimento seqüenciado e fluido, adquire então a posição triangular característica da primeira fase do comportamento aversivo, em que eleva a parte mais interna (ou ventro-medial) do pé, apoiando-se somente pelos bordos laterais e diminuindo a superfície de contato com o substrato. Em seguida, inicia-se a segunda fase de aversão, em que realiza ondas parapodiais laterais e protração de tentáculos e palpos, e finalmente eleva a parte anterior do complexo cabeça-pé a até 1 cm ou mais (Figuras 4 e 5). Assim como ocorre com outros caracóis pulmonados terrestres, o *M. abbreviatus* apresenta um aumento da secreção de muco pedioso sob estímulos nociceptivos, que se torna mais amarelado e espesso (em contraste com a forma fluida e incolor basal), por pelo menos 30 min após o cessamento do estímulo. Para melhor padronização dos dados observados, a latência, ou tempo de reação do comportamento aversivo, é determinada quando o caracol eleva a parte anterior do complexo cabeça-pé a 1 cm do substrato (Achaval *et al.*, 2005).



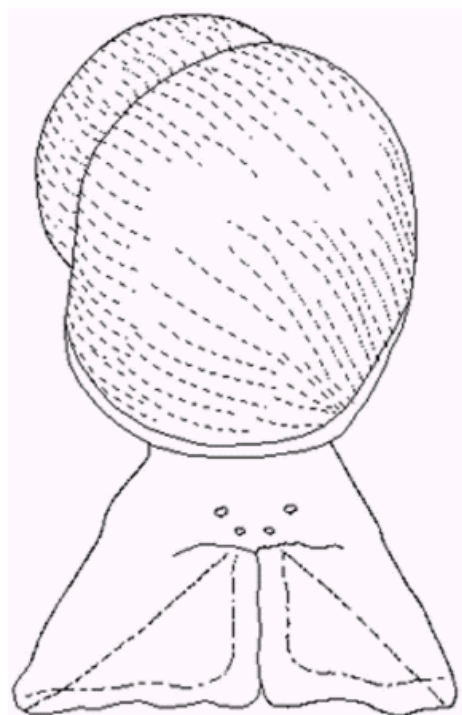


Figura 4. Representação esquemática do caracol *Megalobulimus abbreviatus* na primeira fase do comportamento aversivo sobre placa aquecida a temperatura nociva, com os palpos labiais e tentáculos orais retraídos e o aspecto triangular do complexo cabeça-pé (adaptado de Achaval *et al*, 2005).

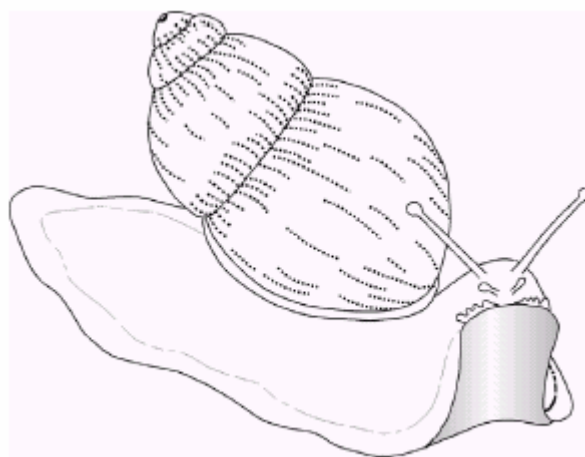


Figura 5. Representação esquemática do caracol *Megalobulimus abbreviatus* na segunda fase do comportamento aversivo sobre placa aquecida a temperatura nociva, com elevação da porção anterior do complexo cabeça-pé (adaptado de Achaval *et al*, 2005).

A administração de sulfato de morfina, metionina-encefalina ou beta-endorfina inibe significativamente o comportamento aversivo provocado por calor. Ainda, o aumento de latência resultante da administração de opióides em *C. nemoralis*, *Limax maximus*, *M. sanctipauli*, and *M. abbreviatus* antes de um estímulo térmico pode ser suprimido pelo antagonista opióide naloxone (Walters, 1987; Romero *et al.*, 1994; Kavaliers, 1986; Achaval *et al.*, 2005). Em adição, a imunorreatividade para encefalina já foi identificada no sistema nervoso central de diferentes gastrópodos, como *Aplysia californica*, *Lymnaea stagnalis*, *Helix pomatia* e *M. abbreviatus* (Elekes *et al.*, 1993; Zancan, 1996). O naloxone, por si, é capaz de diminuir latências provocadas por estresse térmico (Kavaliers *et al.*, 1983; Achaval *et al.*, 2005). Assim, nestes gastrópodos, a habilidade do antagonista opióide não-seletivo naloxone em produzir um bloqueio completo da analgesia por morfina indica que um receptor  $\mu$  está envolvido neste comportamento. Assim como já foi demonstrado que a analgesia a estímulos térmicos pode ser também bloqueada com antagonista de receptor delta (Romero *et al.*, 1994; Nestler *et al.*, 2001; Kavaliers, 1987).

Em moluscos, a capsaicina é capaz de provocar potenciais de ação por correntes de cálcio em neurônios de *Helix pomatia* e *Aplysia californica* (Hernadi *et al.*, 1995; Erdelyi *et al.*, 1986). Entretanto, não há dados semelhantes para o gênero *Megalobulimus*. No comportamento de retirada de *Helix lucorum*, foi proposto um circuito nociceptivo composto de 4 grupos de neurônios: sensoriais (cujos corpos estão nos gânglios pleurais e parietais), neurônios pré-motores de comando (ou interneurônios pré-motores de comando de retirada), os neurônios motores e neurônios modulatórios (Zakharov *et al.*, 1995, Balaban, 2002). Células

sensoriais (mecano-, termo-, quimio- e fotorreceptores) conectam-se aos interneurônios de comando, localizados nos gânglios parietais e pleurais. Estes são nove interneurônios pré-motores que convergem aferências sinápticas, disparando os componentes do comportamento de retirada, através da ativação dos neurônios motores, efetores da resposta comportamental (Balaban, 2002). Os interneurônios de comando são assim considerados sob três critérios: “participação”, na qual respondem a estímulo nocivo que precede à resposta comportamental; “suficiência”, onde a ativação intracelular dispara parte da resposta de retirada; e “necessidade”, quando a hiperpolarização do neurônio inibe o comportamento de retirada. Um único grupo celular não controla exclusivamente o comportamento de retirada do *H. lucorum*, porém, estas células são fundamentais à resposta aversiva. Por fim, a ativação seqüencial de neurônios sensoriais, de comando e motores é regulada por neurônios modulatórios localizados nos gânglios pedais (Balaban, 2002; Figura 6).

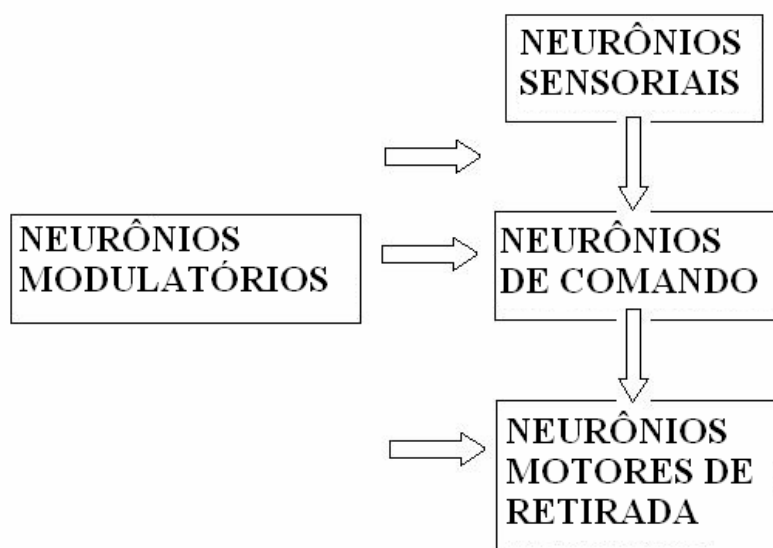


Figura 6. Representação esquemática do circuito de retirada proposto para *Helix lucorum* (modificado de Balaban, 2002).

Tais componentes apresentam semelhança com aqueles encontrados em *M. abbreviatus*, especialmente entre neurônios serotoninérgicos (Swarowski *et al.*, 2005). Apesar da ausência de dados específicos para *M. abbreviatus*, especula-se que a presença de um TRPV neste circuito localizaria-se nos neurônios de 1ª ordem (sensoriais), e ainda no plexo pedioso, região de maior contato com superfícies e rica em substância P (Zancan, 1996; Rigon *et al.*, 1998). Entretanto, estudos com *Helix pomatia* mostraram sensibilidade à capsaicina em neurônios localizados nos gânglios visceral e parietais (principalmente LPa2) e cerebrais (neurônio metacerebral gigante, serotoninérgico) (Hernadi *et al.*, 1995). A localização exata de receptores TRPV no *M. abbreviatus* permanece motivo de especulação. A presença de neurotransmissão baseada em derivados de ácidos graxos, pela ação de fosfolipases sobre lipídeos de membrana em gastrópodos ainda é especulativa, porém alguns estudos demonstraram a participação do ácido araquidônico e derivados na nocicepção em *Limnaea stagnalis*. (Kits *et al.*, 1997; Lopes *et al.*, 1998) Outros trabalhos anteriores demonstraram tanto a presença de sinalização anandamidérgica em *Hermissenda* quanto efeitos diretos do delta-9-tetra-hidrocanabinol em *Aplysia californica* (Acosta-Urquidi *et al.*, 1975; Pivovarov, 1995).

Até o momento, não há dados sobre os ligantes endógenos do TRPV1 em neurônios de moluscos. Também não se dispõe de dados que impliquem o TRPV1, notoriamente um canal ativado por calor, e outros receptores vanilóides, nas respostas aversivas de moluscos e, em particular, nas respostas aversivas do *M. abbreviatus*, a estímulos térmicos nocivos. A perspectiva primária dos estudos com receptores TRPV é a descoberta de drogas analgésicas ou

antinflamatórias que não ajam sobre a ciclooxigenase ou sobre receptores opióides, e sim direta e seletivamente sobre fibras nociceptoras. A presença do canal TRPV1 no *Megalobulimus abbreviatus* reforçaria sua utilidade como modelo de estudos em nocicepção.

O objetivo deste estudo foi medir a resposta nociceptiva (latência aversiva) do *M. abbreviatus* após exposição tópica à capsaicina. De modo a testar se as respostas provocadas pela capsaicina ou pelo calor nocivo seriam mediadas por receptores vanilóides, nós utilizamos o vermelho de rutênio, um antagonista não-seletivo de receptores vanilóides, e a capsazepina, um antagonista específico do receptor vanilóide TRPV1 (Bevan *et al.*, 1992; Maia *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 1997). Posteriormente, foi testado se as respostas aversivas induzidas pela capsaicina poderiam ser moduladas pela morfina e naloxone de formas similares àquelas observadas em estudos anteriores com estímulo térmico nocivo.

## OBJETIVOS

1) Medir a resposta nociceptiva (latência aversiva) do caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus* após exposição tópica à capsaicina, de modo a testar se as respostas provocadas pela capsaicina ou pelo calor nocivo seriam mediadas pelo receptor vanilóide TRPV1. Para isto, foi realizada uma abordagem indireta (farmacológica), utilizando a capsaicina (agonista do receptor TRPV1), vermelho de rutênio (antagonista não-seletivo de receptores vanilóides), e a capsazepina (antagonista específico do receptor vanilóide TRPV1).

2) Demonstrar que as respostas aversivas induzidas pela capsaicina são moduladas por morfina e naloxone de formas similares às aquelas observadas em estudos anteriores com estímulo térmico nocivo (50°C).

3) Uma vez demonstrada a participação do receptor TRPV1 através de evidências farmacológicas, discutir a sua participação como canal ativado por calor em um modelo de estudo de nocicepção utilizado em nosso laboratório e em outros centros.

4) Até o momento, não há dados sobre os ligantes endógenos do TRPV1 em moluscos. A partir da comprovação da presença do receptor TRPV1, espera-se que se inicie a procura de novos TRPVs e endovanilóides no *M. abbreviatus*.

**Capsaicin-induced avoidance behavior in the terrestrial Gastropoda  
*Megalobulimus abbreviatus*: evidence for TRPV-1 signalling and opioid  
modulation in response to chemical noxious stimuli**

Pedro Kalil-Gaspar<sup>a, b</sup>, Simone Marcuzzo<sup>a, b</sup>, Paula Rigon<sup>a, b</sup>, Cynthia Goulart  
Molina<sup>b</sup>, Matilde Achaval<sup>a, b</sup>

<sup>a</sup> *Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

<sup>b</sup> *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*

**Corresponding author: Matilde Achaval**

**Laboratório de Histofisiologia Comparada**

**Departamento de Ciências Morfológicas**

ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite 500

90030-170, Porto Alegre, RS, Brazil

fax: +55 51333163092

e-mail: [achaval@ufrgs.br](mailto:achaval@ufrgs.br)

## **Abstract**

The aim of this study was to measure the nociceptive response (avoidance latency) of the land snail *Megalobulimus abbreviatus* (N = 8 in each group) after capsaicin topical exposure (0.1% and 0.5% in 20% ethanol) and to compare it to a well-studied stressful (50°C) thermal stimulus model. We also tested if ruthenium red, and capsazepine, respectively nonselective and selective TRPV1 receptor antagonists, could modify both capsaicin- and thermal-evoked responses. Finally, animals were pretreated with morphine, naloxone or morphine plus naloxone prior to capsaicin stimuli. Latencies were measured when the animal lifted its head-foot complex 1 cm from the substrate. Data were compared by ANOVA and LSD post hoc, and by Student T Test ( $p < 0.05$ ). **RESULTS:** capsaicin elicited withdrawal behavior in a dose-dependent manner. The capsaicin vehicle (20% ethanol) also evoked a less intense but significant avoidance reaction. Capsazepine and ruthenium red attenuated both capsaicin and heat withdrawal responses, when compared to vehicles. Morphine increased, and naloxone, either alone or in combination with morphine, reduced capsaicin-evoked latencies when compared to morphine or saline. These results indicate that TRPV1 receptor play a role in the *M. abbreviatus* nociceptive circuits.

**Keywords:** avoidance behavior, capsaicin, capsazepine, morphine, nociception, mollusc, ethanol



## Introduction

Capsaicin, the pungent ingredient of red hot pepper, is a naturally-occurring irritant, like olvanil and resiniferatoxin (collectively referred to as vanilloids), that elicits pain by activating specific receptors on sensory nerve endings. The molecular target of capsaicin, the TRPV1 receptor (transient receptor potential channel - vanilloid 1), belongs to the Transient Receptor Potential Channel Superfamily, which shares homology to *Drosophila* Nan gene and to *Caenorhabditis elegans* OCR proteins. The TRPV1 receptor is a nonselective cation channel which promotes calcium influx in vertebrate neurons when activated by vanilloids and noxious stimuli, such as heat (>42°C), low pH, some lipoxigenase products, N-oleoyldopamine and the endocannabinoid anandamide (Jancsó *et al.*, 1967; Caterina *et al.*, 1997; O'Neil *et al.*, 2003; Van der Stelt *et al.*, 2004; Szolcsányi, 2004).

The avoidance behavior of snails to noxious tactile and thermal stimuli is a well described phenomenon. Molluscs like *Cepaea nemoralis*, *Megalobulimus sanctipauli*, *Megalobulimus abbreviatus* and *Aplysia californica* respond to noxious stimuli with a withdrawal reaction accompanied by mucus secretion. When placed on heated substrates, *C. nemoralis* (40°C), *M. sanctipauli* (52°C) and *M. abbreviatus* (50°C) show aversive behavior within a few seconds, characterized by lifting the anterior regions of the head-foot (H-F) complex. This behavior is not detected in snails at lower temperatures, such as 30-33°C or at room temperature (Hirst *et al.*, 1987; Zakharov, 1994; Romero *et al.*, 1994; Achaval *et al.*, 2005).

The administration of morphine sulfate, methionine-enkephalin or  $\beta$ -endorphin markedly suppresses thermally-evoked avoidance behavior. Moreover, the increased latency resulting from opioid administration to *C. nemoralis*, *Limax maximus*, *M. sanctipauli*, and *M. abbreviatus* after a thermal stimulus can be suppressed by the opiate antagonist, naloxone (Kavaliers *et al.*, 1983; Kavaliers *et al.*, 1986; Walters, 1987; Zakharov, 1994; Romero *et al.*, 1994; Achaval *et al.*, 2005). In addition, enkephalin immunoreactivity was identified in the central nervous system of different molluscs such as *A. californica*, *Lymnaea stagnalis*,

*Helix pomatia*, and *M. abbreviatus* (Elekes *et al.*, 1993; Zancan, 1996). Naloxone alone decreases latencies to thermal stress (Kavaliers *et al.*, 1983; Achaval *et al.*, 2005). Thus, in these gastropods the ability of the nonselective opiate antagonist naloxone to produce a complete blockade of morphine analgesia indicates that a  $\mu$  receptor is implicated in this behavior. It was also demonstrated that thermal stimulus-induced analgesia was blocked by a delta receptor antagonist (Kavaliers, 1987; Romero *et al.*, 1994; Nestler *et al.*, 2001).

Until now, there is no data on the endogenous TRPV1 ligands in snail neurons. Also, it was not clear if TRPV1, a notorious heat-gated calcium channel, and other vanilloid receptors were involved in terrestrial molluscs thermal avoidance behavior. In molluscs, capsaicin is able to promote action potentials by calcium currents in *Helix pomatia* and *Aplysia californica* neurons (Erdelyi *et al.*, 1986; Hernadi *et al.*, 1995). However, there is no such data in the *Megalobulimus* genus. The aim of this study was to measure the nociceptive response (avoidance latency) of *M. abbreviatus* after capsaicin topical exposure. In order to test if capsaicin- and thermally-evoked responses were mediated by vanilloid receptors, we used ruthenium red, a nonselective vanilloid-receptor antagonist, and capsazepine, a selective TRPV1 antagonist (Bevan *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1997; Maia *et al.*, 2006). Then we tested if capsaicin-induced aversive responses could be modulated by morphine and naloxone in ways similar to those observed in previous studies with heat noxious stimuli.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Adult land snails, *M. abbreviatus*, Becquaert, 1948, previously classified as *M. oblongus* (Thomé *et al.*, 1994), with shell lengths of 56-80 mm and weighing 29-81 g were collected from the county of Charqueadas, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The animals were kept in a screened terrarium, subjected to normal annual light and temperature variations, and fed lettuce and water *ad libitum*.

## Preparation of solutions

Capsaicin (Laboratório DEG, São Paulo, Brazil) was primarily dissolved in ethanol, and then in distilled water or distilled water plus ethanol for desired concentrations. The capsaicin vehicle containing ethanol had its own control group (distilled water), since ethanol itself is able to potentiate TRPV1 (Trevisani *et al.*, 2002). Ruthenium red (Merck, Germany) was dissolved in distilled water to 1 mg/mL concentration. Capsazepine (Sigma, USA) was first diluted in dimethyl sulphoxide (DMSO; VETEC, Brazil) to 1 mg/mL, and further diluted with saline to the final concentrations of 5% or 1.5% capsazepine. Morphine sulphate (10 mg/mL) and naloxone hydrochloride (0.4 mg/mL) (Cristália do Brasil S/A, São Paulo, SP, Brazil) needed no dilutions.

## *Experimental Procedures*

**0.1% and 0.5% capsaicin topical solutions:** In order to test if capsaicin was able to evoke nociceptive behavior, four groups of snails ( $n = 8$ ) were tested in petri dishes (10-cm diameter), at 22°C room temperature, containing aqueous films of distilled water (vehicle control), 20% ethanol in distilled water (vehicle), 0.1% capsaicin and 0.5% capsaicin solutions. Prior to capsaicin exposure, snails were allowed to hydrate for 1 min, to allow protraction out of their shells. Nociceptive thresholds of individual snails were determined by measuring the latency of their aversive or withdrawal behavior (Kavaliers *et al.*, 1996). The measurements of latency started 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, or when the snail reached the time of 60 seconds with no response (Achaval *et al.*, 2005). The animals were then quickly washed in fresh water to avoid excessive

exposure to capsaicin solution. Capsaicin, at 0.5% concentration, was then chosen for the following tests, for its best uniformity in evoked latency values.

**0.5% capsaicin and ruthenium red:** Three groups (n = 8) were tested in petri dishes, at room temperature, containing 0.5% capsaicin. One group received 1 mL distilled water (vehicle), the second and the third groups received ruthenium red (3 mg/kg and 6 mg/kg body weight, respectively). Ruthenium red and vehicle were injected into the intrahemocoelic cavity through the anterior ventral zone of the foot 5 min prior to capsaicin exposure. Prior to injections and capsaicin exposure, snails were allowed to hydrate for 1 min. Measurements of latency were obtained as described above. The animals were then quickly washed in fresh water.

**Noxious (50°C) heat and ruthenium red:** Three groups (n = 8) were allowed to hydrate for 2 hours. Five minutes before heat exposure, one group received 1 mL distilled water (vehicle) injection, the second and the third groups received ruthenium red injections (3mg/kg and 6mg/kg, respectively). Measurements of latency started when the snail was placed on a 50°C hot plate (model-DS37, Socrel, Comerio, VA, Italy) and ended immediately after the animal lifted the head-foot complex 1 cm (Achaval *et al.*, 2005; Swarowsky *et al.*, 2005). To avoid lack of umidity on the substrate, a plastic film containing distilled water (10 mL at 50°C) was placed over the plate.

**0.5% capsaicin and capsazepine:** Two groups of snails (n = 8) were tested in petri dishes containing 0.5% capsaicin, at room temperature. Capsazepine (0.5% concentration) and vehicle were injected into the intrahemocoelic cavity 5 min prior to capsaicin exposure. The vehicle consisted of DMSO in saline only. Prior to injections and capsaicin exposure, snails were allowed to hydrate for 1 min. Measurements of latency were obtained as described above. The animals were then quickly washed in fresh water.

**Noxious (50°C) heat and capsazepine:** Three groups (n = 8) were allowed to hydrate for 2 hours. Five minutes before heat exposure, one group received a 0.5% capsazepine injection (1 mg/kg), the second received a 1.5% capsazepine injection (3 mg/kg), and the third received vehicle. Latencies were measured as described above.

**0.5% capsaicin solution, morphine and naloxone:** The animals were separated into four groups (n = 8). One group received saline (control group; 1mL), the second received morphine only (20 mg/kg), the third received naloxone only (5 mg/kg) and the fourth received naloxone (5 mg/kg) plus morphine (20 mg/kg). All groups were exposed to 0.5% capsaicin, at room temperature. Drugs and saline were injected into the intrahemocelic cavity 15 min (morphine and saline) prior to capsaicin exposure. Naloxone was injected 5 min prior to morphine. Before injections and capsaicin exposure, snails were hydrated for 1 min. Measurements of latency were obtained as described above. The animals were then quickly washed in fresh water.

### Statistical analysis

For capsazepine *versus* capsaicin group, data (means  $\pm$  SEM) were statistically compared by Student T test. For all other groups, data (means  $\pm$  SEM) were statistically compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Least Significant Difference (LSD) *post hoc* test (level of significance set at  $P < 0.05$ ), in SPSS 7.0 software.

### Results

**0.1% and 0.5% capsaicin topical solutions:** Topical capsaicin elicited robust withdrawal behavior in a dose-dependent manner ( $25.4 \pm 2.0$  s,  $15.3 \pm 1.9$  s and  $9.1 \pm 1.0$  s, for vehicle, 0.1% and 0.5% concentrations, respectively). Vehicle (20%

ethanol) reduced latencies in comparison to distilled water (no response). Moreover, at 0.1% and 0.5% concentrations, capsaicin-induced latencies were shorter than those obtained with 50°C stimuli ( $33.9 \pm 6.4$  s). In contrast to the typical yellowish mucus secretion exhibited in previous studies with noxious heat stimuli (Achaval *et al.*, 2005), no such component was found after capsaicin exposure (Fig. 1).

**0.5% capsaicin solution and ruthenium red:** Ruthenium red injections attenuated capsaicin-evoked responses, increasing latencies at higher (6 mg/kg;  $23.1 \pm 1.9$  s), but not lower doses (3 mg/kg;  $12.7 \pm 1.4$  s; nonstatistically significant), when compared to vehicle ( $16.8 \pm 2.6$  s; Fig.2).

**Noxious (50°C) heat and ruthenium red:** Ruthenium red (3 mg/kg) increased heat-evoked latencies ( $55.4 \pm 6.5$  s), when compared to vehicle ( $33.9 \pm 6.4$  s). Higher doses of ruthenium red did not have additional effects (Fig.3).

**0.5% capsaicin solution and capsazepine:** Capsazepine injection significantly inhibited capsaicin-evoked responses, increasing latencies ( $19.2 \pm 1.8$  s) when compared to vehicle ( $5.3 \pm 0.4$  s; Fig. 4).

**Noxious (50°C) heat and capsazepine:** Capsazepine (1 mg/kg and 3 mg/kg) increased heat-evoked latencies ( $28.1 \pm 1.8$  s and  $48.8 \pm 3.6$  s, respectively) in significant dose-dependent levels, when compared to vehicle ( $20.4 \pm 1.2$  s; Fig. 5).

**0.5% capsaicin solution, morphine and naloxone:** Morphine promoted increased withdrawal latencies ( $26.5 \pm 3.4$  s), with partial retraction of the H-F complex, longer than those observed in control (saline-injected) snails ( $18.2 \pm 2.6$  s). The average response obtained with naloxone alone was significantly shorter than that of the saline-control group ( $8.1 \pm 1.1$  s). Those snails pre-treated with naloxone and injected with morphine 5 min later displayed a similar average response latency ( $8.7 \pm 1.3$  s). The response latencies of this group did not differ

significantly ( $P < 0.05$ ) from those of the animals treated with naloxone alone (Fig. 6).

## Discussion

Topical capsaicin (0.1% and 0.5% concentrations in 20% ethanol) elicited robust withdrawal behavior in a dose-dependent manner with shorter latencies than those obtained with thermal 50°C stimuli. Heat-induced latencies were in agreement with previous studies (Achaval *et al.*, 2005). Capsaicin is a specific ligand of the TRPV1 receptor, and our results point toward a role of TRPV1-mediated signalling in *M. abbreviatus* nociceptive circuits. TRPV1 is a heat-gated channel that opens at temperatures higher than 42°C. Using capsazepine, a specific TRPV1 antagonist, there was a significant inhibition of capsaicin-evoked latencies. Furthermore, capsazepine also increased heat-evoked latencies in a dose-dependent manner, implicating TRPV1 in the response of *M. abbreviatus* to noxious heat.

Ethanol in the capsaicin vehicle revealed to be a confusing bias in our capsaicin results. Unfortunately, DMSO were not available at the time of capsaicin dilution. Compared to distilled water, 20% ethanol alone was able to evoke statistically significant aversive behavior in *M. abbreviatus*. Due to its solvent properties, the irritating effect of ethanol should include some cellular damage. However, several studies have shown that ethanol itself can act through TRPV1 receptors, potentiating capsaicin effects on the channel permeability (Trevisani *et al* 2002; Cortright, *et al*, 2004; Trevisani *et al*, 2004; Gazzieri *et al*, 2006; Benedikt *et al*, 2007). Therefore, it is reasonable to consider the responses to capsaicin as also responses to ethanol, although 0.1% and 0.5% capsaicin concentrations elicited responses in a dose-dependent manner, with the same vehicle concentrations.

Using ruthenium red, a nonspecific antagonist of vanilloid channels, there were increases in both capsaicin-evoked and heat-evoked latencies. Although this is indirect evidence of TRPV1 signalling in molluscal nociceptive circuits, as

capsaicin and capsazepine are specific TRPV1 ligands, one cannot rule out the participation of other members of the vanilloid family in heat-evoked behavior. There are at least six distinct mammalian TRPV receptors. These receptors frequently coexist with TRPV1 in neurons. Three of them are also opened by heat, yet at different temperature thresholds, and are also inhibited by ruthenium red: TRPV3 opens at 33°C, TRPV2 at 55°C and TRPV4 at lower temperatures (Julius *et al.*, 2001; Clapham, 2003). It is noteworthy that ruthenium red, in 6 mg/kg dose, decreased heat-evoked latencies, which could be the result of different actions on different heat-gated vanilloid receptors. However, demonstration of vanilloid receptors in molluscs, except for TRPV1, is still lacking. Also, one can only presume that vanilloid receptors are specifically expressed in *M. abbreviatus* nerve cells, based on the large amount of data in other species, mainly vertebrates. Moreover, studies with rodent skin demonstrate heat-responsive TRPV3 in keratinocytes (Moqrich *et al.*, 2005). Currently, a non-neuronal vanilloid receptor signalling cannot be ruled out for terrestrial molluscs, as these animals are often in close contact to potentially noxious substrates in their natural environments.

The *M. abbreviatus* nociceptive circuits are, at least in part, regulated by opioids. Capsaicin (plus ethanol) elicited aversive behavior that could be modulated by morphine and naloxone in the same way noxious heat was in previous studies. Aversive capsaicin-evoked responses were delayed by morphine and reduced by naloxone either alone or in combination with morphine (Achaval *et al.*, 2005). Altogether, these data suggest an important nociceptive function for TRPV1 in *M. abbreviatus* and demand further investigations on TRPV1 receptor localization and on putative endogenous ligands for TRPV1 in the nervous system of terrestrial molluscs.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful to Antonio Generoso Severino for his technical assistance, to Dr. Neide Kalil Gaspar and Hospital Universitário Antonio Pedro (Rio



de Janeiro, Brazil) for ruthenium red, and to Ms. Caroline Perinazzo and Dr. Aldo Lucion (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for DMSO. This work was supported by Brazilian funding agencies, CNPq and CAPES. M.Achaval is CNPq investigator.

## References

Achaval, M., Penha, M.A.P., 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.

Benedikt, J., Teisinger, J., Vyklicky, L., Vlachova, V., 2007. Ethanol inhibits cold-menthol receptor TRPM8 by modulating its interaction with membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Neurochem.* 100, 211-24.

Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S., Yeats, J.C., 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *J. Biol. Chem.* 107, 544-52.

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.

Clapham, D.E., 2003. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517-24

Cortright, D.N., Szallasi, A., 2004. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur. J. Biochem.* 271,1814-9.

Diakonova, 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, 773-7.

Elekes, K., Stefano, G.B., Carpenter, D.O., 1993. Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods (*Helix pomatia*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica*): a comparative immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.* 272, 257-272.

Erdelyi, L., Such, G., 1986. Effects of capsaicin on molluscan neurons: a voltage clamp study. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 85, 319-27.

Gazzieri, D., Trevisani, M., Tarantini, F., Bechi, P., Masotti, G., Gensini, G.F., Castellani, S., Marchionni, N., Geppetti, P., Harrison, S., 2006. Ethanol dilates coronary arteries and increases coronary flow via transient receptor potential vanilloid 1 and calcitonin gene-related peptide. *Cardiovasc. Res.* 70, 589-99.

Hernadi, L., Erdelyi, L., Parducz, A., Szabadi, H., Such, G., Jancso, G., 1995. In vitro capsaicin-induced cytological changes and alteration in calcium distribution in giant serotonergic neurons of the snail *Helix pomatia*: a light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.* 282, 445-53.

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.

Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., 1967. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 31, 138-51.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203-10.

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., Hirst, M., 1986. Naloxone-reversible stress-induced feeding and analgesia in the 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.

Maia, J.L., Lima-Junior, R.C., Melo, C.M., David, J.P., David, J.M., Campos, A.R., Santos, F.A., Rao, V.S., 2006. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: Possible mechanisms. *Pharmacol Res.* 54, 282-86.

Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S., Andahazy, M., Story, G.M., Patapoutian, A., 2005. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468-72.

Nestler, E.J., Hyman, S.E., Malenka, R.S., 2001. *Molecular Neuropharmacology*. A Foundation for Clinical Neuroscience. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

O'Neil, R.G., Brown, R.C., 2003. The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News. Physiol. Sci.* 18, 226-31.

Romero, S.M.B., Hoffmann, A., Menescal de Oliveira, L., 1994. Is there an opiate receptor in the snail *Megalobulimus sanctipauli*? Action of morphine and naloxone. *Comp. Biochem. Physiol.* 107C, 37-40.

Santos, A.R., Calixto, J.B., 1997. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett.* 235, 73-6.

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

Swarowsky, A., Monteiro, A.F., Xavier, L.L., Zancan, D.M., Achaval, M., 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol.* 141A, 230-8.

Thomé, J.W., Carara, A.E.Q., Mallman, M.T., Lopes, P.T.C., Schneider, V.I., 1994. Manual de aulas práticas de zoologia: estudo morfo-anatômico de um molusco gastrópode mesuretra. *Cadernos EDI-PUCRS, Série Zoologia, Porto alegre.* 30pp.

Trevisani, M., Smart, D., Gunthorpe, M.J., Tognetto, M., Barbieri, M., Campi, B., Amadesi, S., Gray, J., Jerman, J.C., Brough, S.J., Owen, D., Smith, G.D., Randall, A.D., Harrison, S., Bianchi, A., Davis, J.B., Geppetti, P. 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci.* 5, 546-51.

Trevisani, M., Gazzieri, D., Benvenuti, F., Campi, B., Dinh, Q.T., Groneberg, D.A., Rigoni, M., Emonds-Alt, X., Creminon, C., Fischer, A., Geppetti, P., Harrison, S., 2004. Ethanol causes inflammation in the airways by a neurogenic and TRPV1-dependent mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309,1167-73.

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

Walters, E.T., 1987. Multiple sensory neuronal correlates of sitespecific sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci.* 7, 408-417.

Zakharov, I.S., 1994. Avoidance behavior of the snail. *Neurosci. Behav. Physiol.* 24, 63-9

Zancan DM (1996). Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus*. Doctoral thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

## Figures

**Figure 1 – *M. abbreviatus*' responses to capsaicin stimuli in 0.1% and 0.5% concentrations:** Latencies (mean  $\pm$  SEM) measured for stimuli with distilled water, 20% ethanol (capsaicin vehicle), 0.1% and 0.5% capsaicin topical solutions (“a” corresponds to  $p < 0.001$  when compared to distilled water. “b” corresponds to  $p < 0.01$  when compared to vehicle. “c” corresponds to  $p < 0.01$  when compared to 0.1% capsaicin).

**Figure 2 – *M. abbreviatus*' responses to 0.5% capsaicin after ruthenium red injections:** Latencies (mean  $\pm$  SEM) measured for 0.5% capsaicin stimuli after ruthenium red vehicle, 3 mg/kg and 6 mg/kg ruthenium red injections (“a” corresponds to  $p < 0.05$ ).

**Figure 3 – *M. abbreviatus*' responses to noxious heat after ruthenium red injections:** Latencies (mean  $\pm$  SEM) measured for noxious heat plate (50°C) stimuli after ruthenium red vehicle and 3 mg/kg and 6 mg/kg ruthenium red injections (“a” corresponds to  $p < 0.05$ ).

**Figure 4 – *M. abbreviatus*' responses to 0.5% capsaicin after capsazepine injections:** Latencies (mean  $\pm$  SEM) measured for 0.5% capsaicin stimuli after capsazepine vehicle, and 1 mg/kg capsazepine injections (“a” corresponds to  $p < 0.05$ ).

**Figure 5 – *M. abbreviatus*' responses to noxious heat after capsazepine injections:** Latencies (mean  $\pm$  SEM) measured for noxious heat plate (50°C) stimuli after capsazepine vehicle, 1 mg/kg and 3 mg/kg capsazepine injections (“a” corresponds to  $p < 0.05$  when compared to vehicle. “b” corresponds to  $p < 0.001$  when compared to 1 mg/kg capsazepine).

**Figure 6 – *M. abbreviatus*' responses to 0.5% capsaicin stimuli after morphine and naloxone injections:** Latencies (mean  $\pm$  SEM) measured for 0.5% capsaicin stimuli after saline, morphine, naloxone and naloxone plus morphine injections (“a” corresponds to  $p < 0.05$  when compared to saline. “b” corresponds to  $p < 0.001$  when compared to morphine).

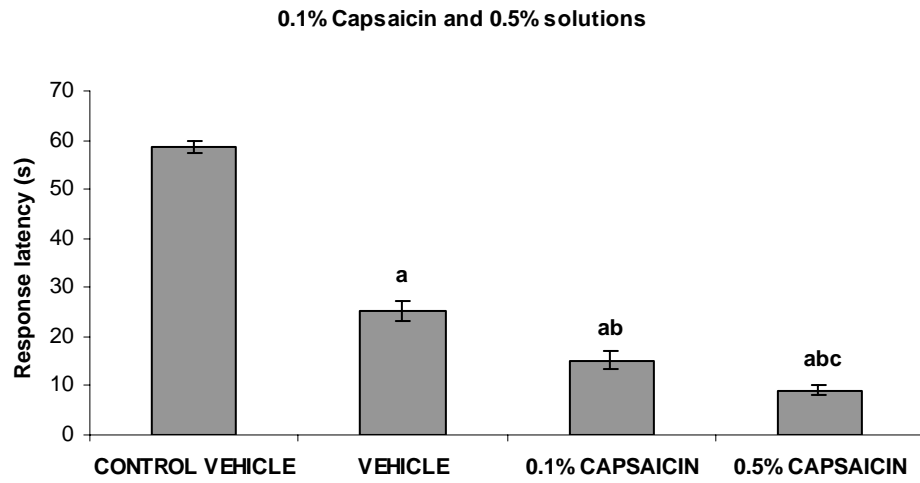


Figure 1

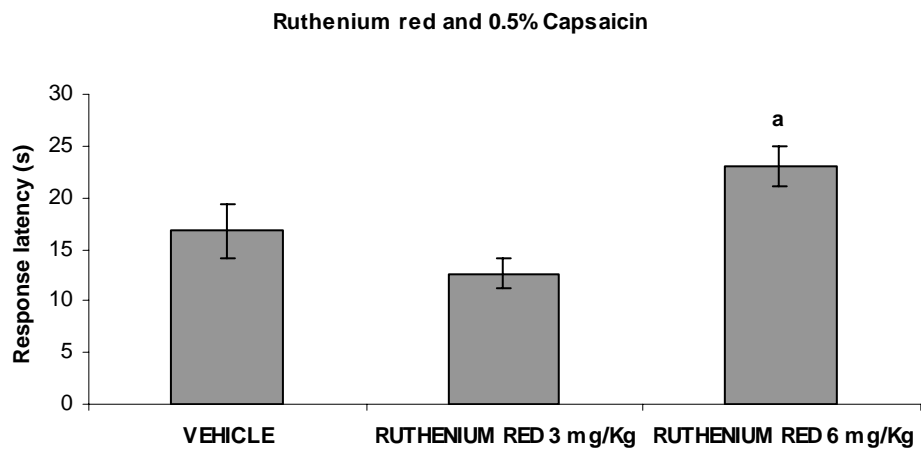


Figure 2



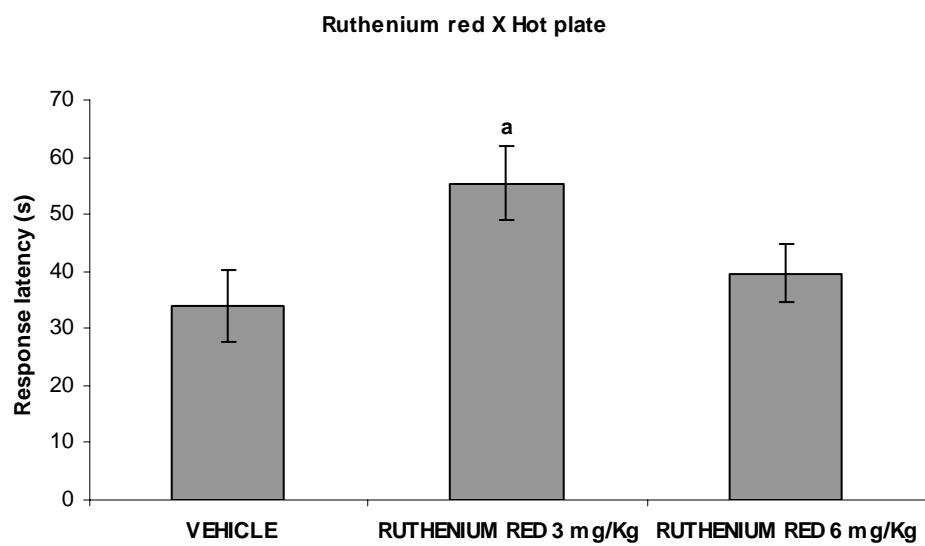


Figure 3

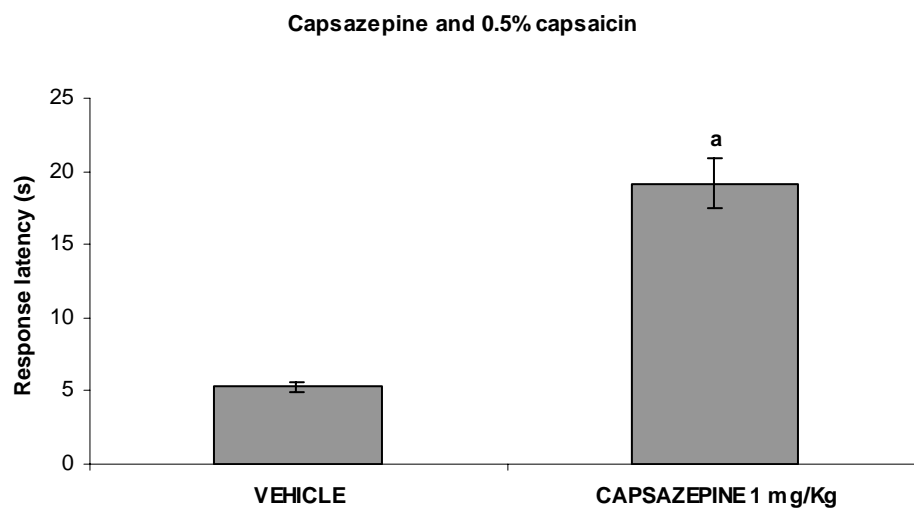


Figure 4

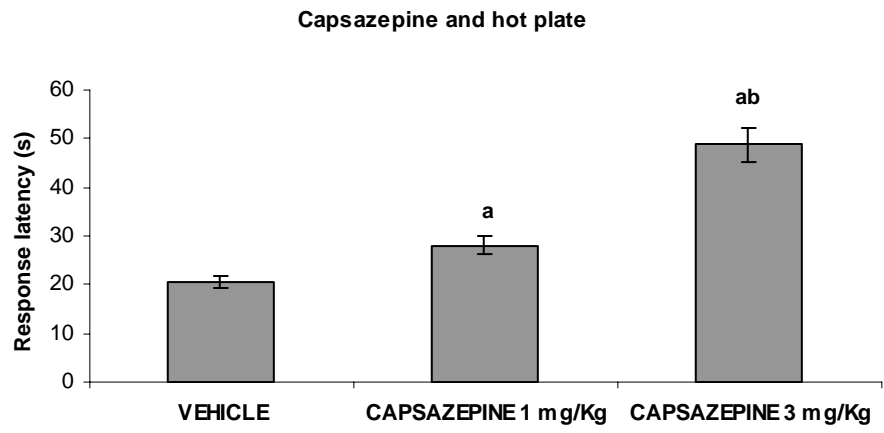


Figure 5

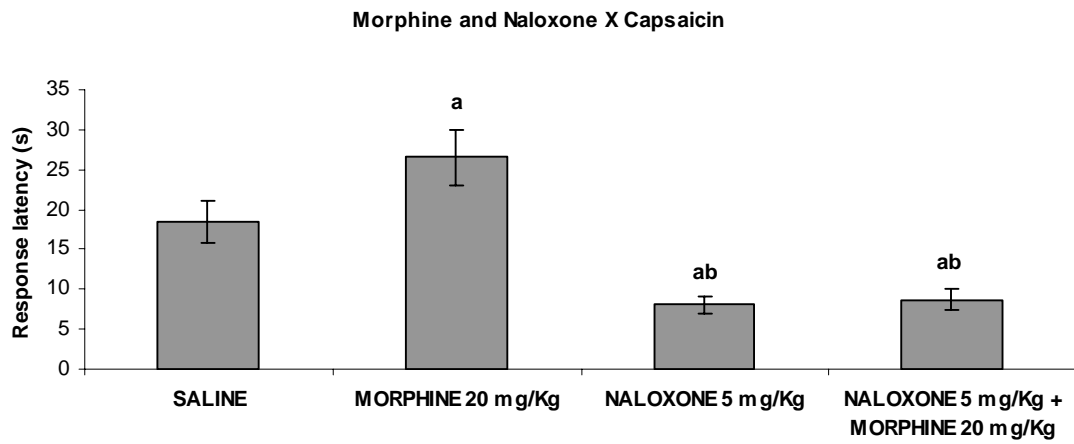


Figure 6

## CONCLUSÕES

1) Foi demonstrada resposta nociceptiva (latência aversiva) do caracol terrestre *Megalobulimus abbreviatus* após exposição tópica à capsaicina, de modo que as respostas provocadas pela capsaicina ou pelo calor nocivo são mediadas, ao menos em parte, pelo receptor vanilóide TRPV1. Para isto, foi realizada uma abordagem indireta (farmacológica), utilizando a capsaicina (agonista do receptor TRPV1), vermelho de rutênio (antagonista não-seletivo de receptores vanilóides), e a capsazepina (antagonista específico do receptor vanilóide TRPV1).

2) Demonstrou-se que as respostas aversivas induzidas pela capsaicina são moduladas por morfina e naloxone de formas similares às aquelas observadas em estudos anteriores com estímulo térmico nocivo (50°C).

## PERSPECTIVAS

Até o momento, não há dados sobre os ligantes endógenos do TRPV1 em neurônios de moluscos. Também não se dispõe de dados que impliquem o TRPV1, notoriamente um canal ativado por calor, e outros receptores vanilóides, nas respostas aversivas de moluscos e, em particular, nas respostas aversivas do *M. abbreviatus*, a estímulos térmicos nocivos. A partir da comprovação da presença do receptor TRPV1, espera-se que se inicie a procura de novos TRPVs e endovanilóides no *M. abbreviatus*. A perspectiva primária dos estudos com receptores TRPV é a descoberta de drogas analgésicas ou anti-inflamatórias que não ajam sobre a ciclooxigenase ou sobre receptores opióides, e sim direta e

seletivamente sobre fibras nociceptoras. A presença do canal TRPV1 no *Megalobulimus abbreviatus* reforça sua utilidade como modelo de estudos em nocicepção.

### Referências Bibliográficas

Achaval, M., Penha, M.A.P., 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.

Acosta-Urquidi, J., Chase, R., 1975. The effects of delta9-tetrahydrocannabinol on action potentials in the mollusc *Aplysia*. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 53: 793-8.

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

Bevan, S., Hothi, S., Hughes, G., James, I.F., Rang, H.P., Shah, K., Walpole, C.S., Yeats, J.C., 1992. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *J. Biol. Chem.*, 107: 544-52.

Carafoli, E., 2002. Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 99: 1115-22.

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.

Caterina, M.J., Julius, D., 2001. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24: 487-517.

Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D., 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4, 5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition. *Nature*, 411: 957-962.

Clapham, D.E., Julius, D., Montell, C., Schultz, G., 2005. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev.*, 57: 427-450.

Cosens, D., 1971. Blindness in a *Drosophila* mutant. *J. Insect Physiol.*, 17: 285-302.

Cosens, D.J., Manning, A. 1969. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature*, 224: 285-287.

Elekes, K., Stefano, G.B., Carpenter, D.O., 1993. Enkephalin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of gastropods (*Helix pomatia*, *Lymnaea*

*stagnalis*, *Aplysia californica*): a comparative immunohistochemical study. *Cell Tissue Res.*, 272: 257-272.

Erdelyi, L., Such, G., 1986. Effects of capsaicin on molluscan neurons: a voltage clamp study. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, 85: 319-27.

Ferrer-Montiel, A., Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., Planells-Cases, R., 2004. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1820-6.

Hardie, R.C., Minke, B., 1992. The *trp* gene is essential for a light activated Ca<sup>2+</sup> channel in *Drosophila* photoreceptors. *Neuron*, 8: 643-651.

Hernadi, L., Erdelyi, L., Parducz, A., Szabadi, H., Such, G., Jancso, G., 1995. In vitro capsaicin-induced cytological changes and alteration in calcium distribution in giant serotonergic neurons of the snail *Helix pomatia*: a light- and electron-microscopic study. *Cell Tissue Res.*, 282: 445-53.

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.

Hoenderop, J.G., Nilius, B., Bindels, R.J., 2005. Calcium absorption across epithelia, *Physiol. Rev.*, 85: 373-422.

Hu, H.Z., Gu, Q., Wang, C., Colton, C.K., Tang, J., Kinoshita-Kawada, M., Lee, L.Y., Wood, J.D., Zhu, M.X., 2004. 2-Aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J. Biol.Chem.*, 279: 35741-35748.

Jancsó, N., Jancsó-Gábor, A., Szolcsányi, J., 1967. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, 31: 138-51.

Julius, D., Basbaum, A.I., 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413: 203-10.

Kalil-Gaspar, P., 2003. Neuropeptídeos na pele. *An. Bras. Dermatol.*, 78: 483-98.

Kavaliers, M., Hirst, M., Teskey, G.C., 1983. A functional role for an opiate system in snail thermal behavior. *Science*, 220: 99-101.

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

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., 1988. Evolutionary and comparative aspects of nociception. *Brain Res. Bull.*, 21: 923-31.

Kits, K.S., Lodder, J.C., Veerman, M.J., 1997. Phe-Met-Arg-Phe-amide activates a novel voltage-dependent K<sup>+</sup> current through a lipoxygenase pathway in molluscan neurones. *J. Gen. Physiol.*, 110: 611-28.

Lopes, C.M., Franks, N.P., Lieb, W.R., 1998. Actions of general anaesthetics and arachidonic pathway inhibitors on K<sup>+</sup> currents activated by volatile anaesthetics and FMRFamide in molluscan neurones. *Br. J. Pharmacol.*, 125: 309-18.

Maia, J.L., Lima-Junior, R.C., Melo, C.M., David, J.P., David, J.M., Campos, A.R., Santos, F.A., Rao, V.S., 2006. Oleanolic acid, a pentacyclic triterpene attenuates capsaicin-induced nociception in mice: Possible mechanisms. *Pharmacol Res.*, 54: 282-86.

Minke, B., 2006. TRP channels and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium*, 40: 261-275.

Nestler, E.J., Hyman, S.E., Malenka, R.S., 2001. *Molecular Neuropharmacology*. A Foundation for Clinical Neuroscience. McGraw-Hill Companies, Inc., New York.

Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G., Bindels, R.J., 2005. TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch.* 451, 181-92.



Nilius, B., Voets, T., 2005. TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels. *Pflugers Arch.*, 451: 1-10.

O'Neil, R.G., Brown, R.C., 2003. The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News. Physiol. Sci.*, 18: 226-31.

Pivovarov, A.S., 1995. Regulation of neuron cholinoreceptor plasticity of *Helix lucorum* by second messengers and opioids. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 110: 229-40.

Rigon, P., Oliveira, A.H., Faccioni-Heuser, M.C., Zancan, D.M., Achaval, M., 1998. Imunorreatividade a substância P no plexo pedioso do caracol terrestre *Megalobulimus oblongus*. VII Congresso Ibero-Americano de Biologia Celular. Montevideo. Uruguai.

Romero, S.M.B., Hoffmann, A., Menescal de Oliveira, L., 1994. Is there an opiate receptor in the snail *Megalobulimus sanctipauli*? Action of morphine and naloxone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 107C: 37-40.

Rosenbaum, T., Gordon-Shaag, A., Munari, M., Gordon, S.E., 2004. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J. Gen.Physiol.*, 123: 53-62.

Sanberg, P.R., Ossenkropp, K., Kavaliers, M., 1988. The Behavioral Biology of Nociception: an introduction to the Symposium. *Brain Res. Bull.*, 21: 921-22.

Santos, A.R., Calixto, J.B., 1997. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett.*, 235: 73-6.

Stander, S., Moorman, C., Schumacher, M., Budenkotte, J., Artuc, M., Shpacpvitch, V., Brzoska, T., Lippert, U., Henz, B.M., Luger, T.A., Metze, D., Steinhoff, M. 2004. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.*, 13: 129-9.

Steinhoff, M., Stander, S., Seeliger, S., Ansel, J.C., Schmelz, M., Luger, T.A. 2003. Modern aspects of cutaneous inflammation. *Arch. Dermatol.*, 139: 1479-88.

Swarowsky, A., Monteiro, A.F., Xavier, L.L., Zancan, D.M., Achaval, M., 2005. Serotonergic immunoreactivity in the pedal ganglia of the pulmonate snail *Megalobulimus abbreviatus* after thermal stimulus: A semi-quantitative analysis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 141A: 230-8.

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

Van der Stelt, M., Di Marzo, V., 2004. Endovanilloids; Putative endogenous ligands of transient receptor potential vanilloid 1 channels. *Eur. J. Biochem.*, 271: 1827-1834.

Walters, E.T., 1987. Multiple sensory neuronal correlates of sitespecific sensitization in *Aplysia*. *J Neurosci.*, 7: 408-417.

Xu, H., Delling, M., Jun, J.C., Clapham, D.E., 2006. Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat. Neurosci.*, 9: 628-635.

Zakharov, I.S., 1994. Avoidance behavior of the snail. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 24: 63-9.

Zancan DM (1996). Localização de mediadores químicos nos gânglios nervosos centrais e tentaculares e inervação da glândula corpo dorsal do caracol pulmonado *Megalobulimus oblongus*. Doctoral thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.