

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Jorge Felipe Argenta Model

Efeitos Metabólicos da Adrenalina no caranguejo *Neohelice granulata*

Porto Alegre

2015

JORGE FELIPE ARGENTA MODEL

Efeitos Metabólicos da Adrenalina no caranguejo *Neohelice granulata*

Trabalho apresentado à Faculdade de  
Veterinária como requisito parcial para a  
obtenção da graduação em Medicina  
Veterinária

Orientadora: Anapaula Sommer Vinagre

Porto Alegre

2015

## RESUMO

As catecolaminas possuem várias ações em vertebrados, estão envolvidas na resposta simpática e participam da regulação do metabolismo intermediário. Entre suas ações sobre o metabolismo estão: aumentar as concentrações de glicose no sangue, diminuir a captação de glicose pelos tecidos periféricos, estimular a glicogenólise, aumentar as concentrações de ácidos graxos livres no sangue ao estimular a lipólise nos adipócitos. Em crustáceos, existem trabalhos envolvendo a ação das monoaminas no metabolismo intermediário, mas não se tem muitos dados sobre a ação da adrenalina sobre a fisiologia desses animais. Alguns dados mostram que ela possui ação hiperglicemiante em animais intactos e em animais sem pedúnculo ocular e está envolvida, na ação hiperglicemiante em animais submetidos a estresse térmico. Os objetivos deste trabalho são investigar os efeitos da adrenalina sobre parâmetros metabólicos do caranguejo *Neohelice granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC).

Nos estudos *in vivo*, caranguejos alimentados com a dieta RC e RP receberam injeções de adrenalina a 10mM e 15, 30 e 60 min após, foram coletadas amostras de hemolinfa para a determinação da concentração de glicose e de triglicerídeos (TGL) pelo método colorimétrico. Foi escolhido o tempo de 30 min para a coleta de hemolinfa e tecidos (hepatopâncreas, músculo mandibular, brânquias anteriores e posteriores) após a administração de doses crescentes de adrenalina (0,001 a 1mM). As amostras de tecidos foram utilizadas para a extração e determinação da concentração de glicogênio. Nos estudos *in vitro*, pedaços de hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores foram incubados em solução fisiológica de crustáceos (SFC) na presença ou ausência de adrenalina para a realização de uma curva de tempo e de uma curva de dose. Após a incubação, foram determinadas as concentrações de glicogênio nos tecidos e a liberação de glicose e de glicerol nos meios de incubação. Finalmente, os tecidos foram incubados em meios contendo SFC acrescido de 0,15 $\mu$ Ci de [U-<sup>14</sup>C]-glicose, 5mM glicose, ácido ascórbico e adrenalina (10<sup>-4</sup>M), para a determinação da oxidação de glicose e formação de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>.

A administração de adrenalina causou aumento na glicemia e diminuição na concentração de triglicerídeos na hemolinfa de caranguejos *N. granulata*. O efeito hiperglicemiante foi observado uma hora após a administração em três doses diferentes de adrenalina, não sendo dose-dependente. Ela também causou diminuição na concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo mandibular, mas não alterou significativamente a

concentração de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores. A dieta dos animais (RP ou RC) influenciou o efeito da adrenalina.

Nos estudos *in vitro* os valores de glicogênio e a secreção de glicose para os meios foram significativamente mais elevados nos hepatopâncreas de animais RC em relação aos RP, demonstrando que o efeito da dieta permanece em condições *in vitro*. A administração de doses crescentes de adrenalina reduziu a secreção de glicose no hepatopâncreas de animais RP e não causou alterações significativas na concentração de glicogênio. A oxidação de glicose a CO<sub>2</sub>, não apresentou diferenças quanto às dietas ou pela presença de adrenalina. A secreção basal de glicerol para o meio de incubação do hepatopâncreas não sofreu alterações significativas. Assim como no experimento *in vivo*, os valores de glicogênio em ambas as brânquias não sofreram alterações devido às dietas, nem pela presença de adrenalina. Nas brânquias anteriores, os valores de glicose no meio se mantiveram constantes, porém, nas posteriores, reduziram na dose 10<sup>-6</sup>M. A oxidação de glicose a CO<sub>2</sub> foi mais elevada nas brânquias anteriores e posteriores de animais alimentados com a dieta RP do que com a dieta RC. A adrenalina não afetou a oxidação da glicose nas brânquias anteriores, mas a aumentou nas brânquias posteriores de animais RP. No músculo mandibular, adrenalina não afetou a oxidação da glicose.

Os resultados dos experimentos *in vivo* sugerem a presença de receptores adrenérgicos no hepatopâncreas e no músculo mandibular, enquanto os experimentos *in vitro* sugerem que esses receptores também possam estar presentes nas brânquias anteriores e brânquias posteriores do caranguejo *N. granulata*. Os efeitos da adrenalina são influenciados pela composição da dieta oferecida aos caranguejos. Estudos *in vitro*, com a utilização de antagonistas seletivos e de noradrenalina, assim como a clonagem e o sequenciamento da estrutura molecular dos receptores adrenérgicos são necessários para a melhor compreensão dos efeitos metabólicos da adrenalina em crustáceos.

## ABSTRACT

Although well described in vertebrates, little is known about the physiological and metabolic functions of catecholamines, especially epinephrine, in crustaceans. The aim of this study was to verify the effects of epinephrine on some aspects of the carbohydrate and lipid metabolism of *Neohelice granulata* crabs fed on a high-protein (HP) or carbohydrate-rich (HC) diet.

Epinephrine (10mM) was injected in the crabs and after 15, 30 or 60 min, hemolymph samples were collected to determine glucose and triglycerides concentration. In another experiment, increasing doses of epinephrine were injected and, 30 min after, samples of hemolymph and of hepatopancreas, mandibular muscle and gills were collected to determine the concentration of glycogen. In another set of experiments, tissue samples were incubated in the presence or absence of epinephrine to determine the concentration of glycogen in the tissues and of glucose and glycerol in the incubation media. Finally, the tissues were incubated with 0,15 $\mu$ Ci of [U- $^{14}$ C]-glucose to determine the effect of epinephrine on glucose oxidation by the production of  $^{14}$ CO $_2$ .

The administration of epinephrine caused hyperglycemia independently of the dosage and decreased glycogen levels in the hepatopancreas and mandibular muscle of HP crabs. A reduction on circulating triglycerides levels occurred in crabs fed with HP diet. In the crabs fed with HC diet, hepatopancreas glycogen and glucose levels in the incubation media were higher than in HP crabs. The diet did not altered glycogen concentrations or glucose levels in the media in both types of gills. Epinephrine did not altered glycogen levels in any of the tissues, however it decreased the glucose concentration in the media of hepatopancreas and posterior gills of HP crabs and increased glucose oxidation to  $^{14}$ CO $_2$  in posterior gills of HP crabs. Glycerol secretion, an indicator of lipolysis, was not altered by epinephrine.

Taken together, these results suggest the presence of epinephrine receptors in all the tissues of *N. granulata* studied. It also evidences that epinephrine effects are influenced by the composition of the diet fed to the crabs. Epinephrine effects may be direct or indirect, by stimulating the secretion of crustacean hyperglycemic hormone. Further studies, using norepinephrine and antagonists are necessary to further address this point.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Síntese de adrenalina a partir de tirosina

**Figura 2** – Amplificação de sinal por cascatas de segundos mensageiros acoplados á proteína G.

**Figura 3** - Efeito da administração de 10 mM de adrenalina sobre a concentração hemolinfática de glicose (A) e triglicerídeos (B), em caranguejos *N. granulata* em diferentes tempos.

**Figura 4** - Efeito da administração de adrenalina em diferentes doses sobre a concentração hemolinfática de glicose (A) e triglicerídeos (B), em caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC).

**Figura 5** - Efeito da administração de adrenalina em diferentes doses sobre a concentração de glicogênio nas brânquias anteriores (A) e nas brânquias posteriores (B) de caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta RP ou RC.

**Figura 6** - Efeito da administração de adrenalina em diferentes doses sobre a concentração de glicogênio no hepatopâncreas (A) e no músculo mandibular (B) de caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta rica em proteínas RP ou RC.

**Figura 7** - Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a liberação de glicose para o meio de incubação de brânquias anteriores (A), de brânquias posteriores (B) e de hepatopâncreas (C) de *Neohelice granulata*.

**Figura 8** - Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a liberação de glicerol para o meio de incubação de hepatopâncreas de *Neohelice granulata*.

**Figura 9** - Efeito de diferentes doses de adrenalina ( $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M e  $10^{-3}$ M) na liberação de glicose para o meio de incubação de brânquias anteriores (A), de brânquias posteriores (B) e de hepatopâncreas (C) de *Neohelice granulata*.

**Figura 10** - Efeito de diferentes doses de adrenalina ( $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M e  $10^{-3}$ M) na liberação de glicerol para o meio de incubação de hepatopâncreas de *Neohelice granulata*.

**Figura 11**- Efeito de diferentes doses de adrenalina ( $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M e  $10^{-3}$ M) na concentração de glicogênio em brânquias anteriores (A), brânquias posteriores (B) e hepatopâncreas (C) de *Neohelice granulata*.

**Figura 12** - Efeito da adrenalina ( $10^{-4}$ M) sobre a oxidação de [U  $^{14}$ C] glicose em amostras de brânquias anteriores (A) e brânquias posteriores (B) de *Neohelice granulata*, após 60 minutos de incubação.

**Figura 13** - Efeito da adrenalina ( $10^{-4}$ M) sobre a oxidação de [U  $^{14}$ C] glicose em amostras de hepatopâncreas (A) e músculo mandibular (B) de *Neohelice granulata*, após 60 minutos de incubação.



## **LISTA DE QUADROS**

**QUADRO 1-** Classificação dos receptores de adrenalina em mamíferos

## LISTA DE ABREVIATURAS

**GPCR** - receptores associados a proteínas G

**IP<sub>3</sub>** - Inositol trifosfato

**DAG** - diacilglicerol

**AMPc** - monofosfato de adenosina cíclico

**PKA** - proteína quinase dependente do AMPc

**TAG** – triacilglicerol

**LSH** - lípase sensível a hormônio

**G3P** - glicerol-3-fosfato

**DHAP** - diidroxiacetonafofosfato

**HPLC** - high performance liquid chromatography

**CHH** - hormônio hiperglicêmico de crustáceos

**RP** – dieta rica em proteínas

**RC** – dieta rica em carboidratos

**SFC** – solução fisiológica para crustáceos

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	21
1.1.1 Objetivos/Metas específicos.....	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
2.1 Coleta e manutenção dos animais.....	22
2.2 Procedimentos experimentais.....	22
2.3 Estudos “ <i>in vivo</i> ”.....	23
2.3.1 Curva de tempo para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos.....	23
2.3.2 Curva de dose para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos e a concentração de glicogênio tecidual.....	23
2.4 Estudos “ <i>in vitro</i> ”.....	24
2.4.1 Curva de tempo para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.....	24
2.4.2 Curva de dose para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.....	24
2.4.3 Efeito da adrenalina sobre a oxidação de <sup>14</sup> C-glicose em brânquias anteriores, brânquias posteriores e hepatopâncreas.....	25
2.5 Análises bioquímicas.....	26
2.6 Análise estatística.....	26
3 RESULTADOS.....	27
3.1 Estudos “ <i>in vivo</i> ”.....	27
3.1.1 Curva de tempo para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos.....	27
3.1.2 Curva de dose para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos e a concentração de glicogênio tecidual.....	28
3.2 Estudos “ <i>in vitro</i> ”.....	31
3.2.1 Curva de tempo para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.....	31
3.2.2 Curva de dose para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.....	33
3.2.3 Efeito da adrenalina sobre a oxidação de <sup>14</sup> C-glicose em brânquias anteriores, brânquias posteriores e hepatopâncreas.....	36

4 DISCUSSÃO.....	39
4.1 Estudos in vivo.....	39
4.2 Estudos <i>in vitro</i> .....	41
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS .....	46

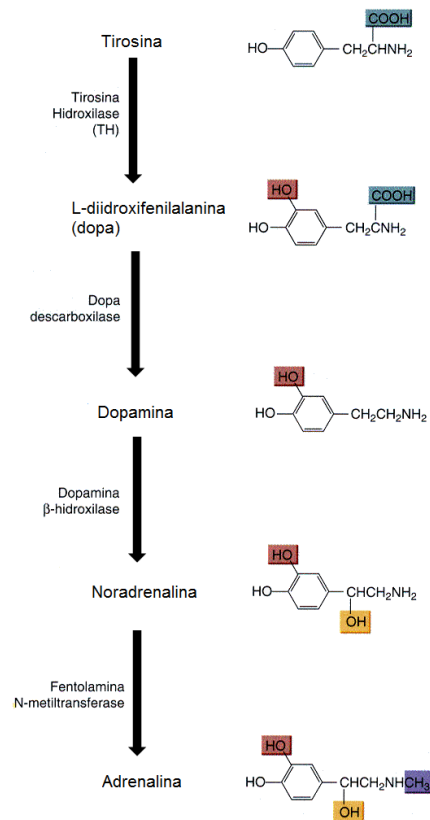
## 1 INTRODUÇÃO

A adrenalina é uma molécula pertencente ao grupo das monoaminas. Este grupo de moléculas é subdividido em dois grupos: as indoleaminas que possuem um anel indólico, e as catecolaminas, que contém um anel catecol em sua estrutura. Como exemplo de indoleamina de grande importância biológica pode-se citar a serotonina (5-hidroxitriptamina). A adrenalina, a noradrenalina, a dopamina e a dopa fazem parte do grupo das catecolaminas. Essas são moléculas sinalizadoras muito conservadas que surgiram a cerca de 700 milhões de anos (CERESÉR e VIANNA, 2004; RANG e cols., 2008).

Nos vertebrados a adrenalina é sintetizada principalmente na medula adrenal. Ela é produzida a partir do aminoácido tirosina, que passa por uma série de alterações estruturais formando outras moléculas biologicamente ativas (dopamina e noradrenalina) antes de chegar à adrenalina (Figura 1). Sua liberação da medula adrenal para a circulação sistêmica acontece em resposta ao estímulo de neurônios pré-ganglionares simpáticos colinérgicos, que são estimulados durante situações como o jejum, o exercício físico, o estresse e em ocasiões de alarme ou “luta ou fuga”. A adrenalina possui diversos efeitos distintos, tais como aumentar a frequência e a contratilidade cardíaca, bronquiodilatação, redução nos movimentos peristálticos além de participar da regulação do metabolismo intermediário (KOEPPEN e STANTON, 2009). Entre suas ações sobre o metabolismo estão: aumentar as concentrações de glicose e de lactato no sangue, diminuir a captação de glicose pelos tecidos periféricos, estimular a glicogenólise, aumentar as concentrações de ácidos graxos livres no sangue ao estimular a lipólise nos adipócitos (WESTFALL e WESTFALL, 2006).

As ações da adrenalina e também da noradrenalina dependem da associação delas aos seus receptores, que são denominados  $\alpha$  e  $\beta$  adrenérgicos. Esses receptores são subclassificados com base nas ações fisiológicas, nos sistemas de segundos mensageiros utilizados e em suas diferentes afinidades por vários ligantes (CERESÉR e VIANNA, 2004). O quadro 1 descreve resumidamente os tipos e subtipos de receptores adrenérgicos, seus mecanismos de ação e exemplos de fármacos agonistas e antagonistas (CERESÉR e VIANNA, 2004; RANG e cols., 2008).

Figura 1– Síntese de adrenalina a partir de tirosina. Fonte: Bear e cols. (2002).



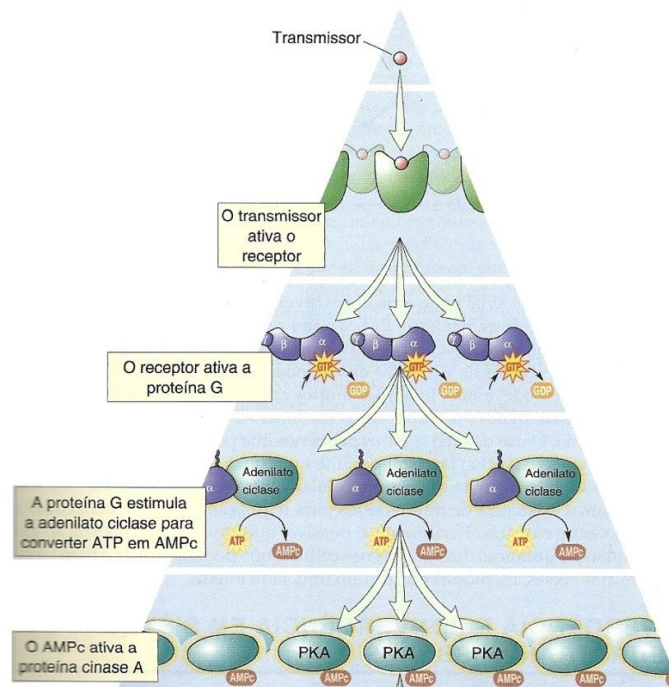
Os receptores adrenérgicos fazem parte da família de receptores GPCR (receptores associados a proteínas G). Quando são ativados os  $\beta$  receptores interagem com a subunidade  $\alpha$  da proteína G, fazendo com que ela estimule a enzima adenilato ciclase, presente na superfície interna das membranas celulares, a sintetizar AMPc. O AMPc atua como um segundo mensageiro intracelular (BENDER e MAYES, 2007; CHAMPE e cols., 2009). Este tipo de sinalização embora lento, tem como vantagem a amplificação do sinal, pois a ativação de um receptor acoplado a proteína G pode levar a ativação de várias proteínas quinase dependente do AMPc (PKA) (Figura 2) (BEAR et al., 2002). Além das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), o glucagon também pode estimular a síntese de AMPc. A ação desses hormônios termina quando a enzima fosfodiesterase hidrolisa o AMPc. A ação da fosfodiesterase pode ser regulada pela estimulação hormonal, pois se sabe que no fígado, a insulina aumenta a sua atividade (BENDER e MAYES, 2007; CHAMPE e cols., 2009).

Quadro 1- Tipos e subtipos de receptores adrenérgicos. Fonte: KATZUNG, 2008; REYNISDOTTIR et al., 1994.

Receptor		Mecanismo de Ação	Agonista	Antagonista
$\alpha$	A <sub>1</sub>	$\alpha_{1A}$	Metoxamina Fenilefrina	Prazosina ( $\alpha_1$ , $\alpha_2$ )
		$\alpha_{1B}$		
		$\alpha_{1D}$		
	A <sub>2</sub>	$\alpha_{2A}$	Clonidina ( $\alpha_2$ )	Ioimbina ( $\alpha_2$ )
		$\alpha_{2B}$		
		$\alpha_{2C}$		
$\beta$	$\beta_1$	$\uparrow$ Adenilato-ciclase e a síntese de AMPc	Dobutamina ( $\beta_1$ )	Metoprolol ( $\beta_1$ )
	$\beta_2$		Salbutamol ( $\beta_2$ )	Betaxolol ( $\beta_1$ )
	$\beta_3$		Terbutalina ( $\beta_2$ ) Isoproterenol ( $\beta_1, \beta_2$ )	Butoxamina ( $\beta_2$ ) Propranolol ( $\beta_1, \beta_2$ )

IP3: Inositol trifosfato, DAG: diacilglicerol, AMPc: monofosfato de adenosina cíclico.

Figura 2– Amplificação de sinal por cascatas de segundos mensageiros acoplados à proteína G. Fonte: Bear e cols. (2002).



O efeito de estimulação a glicogenólise da adrenalina no fígado, e da noradrenalina no músculo esquelético se dá pelo aumento nos níveis de AMPc, aumento que no caso do fígado também pode ser causado pelo glucagon. O aumento de AMPc ativa a PKA, que catalisa a fosforilação pelo ATP da fosforilase quinase b inativa para dar origem à fosforilase quinase a ativa. Essa enzima por sua vez, fosforila a glicogênio fosforilase b (inativa) para formar a glicogênio fosforilase a, forma ativa da enzima chave da glicogenólise (BENDER e MAYES, 2007).

A enzima responsável pela síntese de glicogênio é a glicogênio sintase. Assim como a glicogênio fosforilase a ativação dela depende da concentração de AMPc e da atividade da PKA. A diferença fundamental é que: quando ocorre aumento de AMPc e consequentemente da atividade da PKA a glicogênio fosforilase é ativada e a glicogênio sintase é inibida, logo quando a concentração de AMPc diminui ocorre a ativação de glicogênio sintase e inibição da fosforilase. Assim, a inibição da glicogenólise resulta na intensificação da glicogênese, e a inibição da glicogênese resulta na intensificação da glicogenólise. As desfosforilações da glicogênio fosforilase a, da fosforilase quinase e da glicogênio sintase b são catalisadas por uma única enzima com ampla especificidade, a proteína fosfatase-1, que é inibida pela



proteína quinase dependente de AMPc através do inibidor-1. Assim, a glicogenólise pode ser interrompida e a glicogênese ser estimulada, ou vice-versa, sincronicamente, porque ambos os processos dependem da atividade da proteína quinase dependente de AMPc (BENDER e MAYES, 2007; CHAMPE e cols., 2009).

A adrenalina e a noradrenalina são consideradas os hormônios lipolíticos mais importantes em humanos (REYNISDOTTIR et al., 1994; PEDERSEN et al., 2004). Porém, como os adipócitos possuem tanto os receptores  $\alpha$  como os  $\beta$ , a lipólise é controlada pelo equilíbrio entre os receptores  $\beta$  (lipolíticos) e  $\alpha$  (anti-lipolíticos). Nos adipócitos viscerais de humanos, a estimulação da lipólise depende da presença de uma população de receptores  $\beta$  maior que a de receptores  $\alpha$  (PEDERSEN et al., 2004).

Os ácidos graxos armazenados nos adipócitos na forma de triacilglicerol (TAG) são a principal reserva energética do organismo de mamíferos. A mobilização de lipídeos armazenados requer a hidrólise dos TAGs, liberando três ácidos graxos e uma molécula de glicerol. Esse processo é iniciado pela lipase sensível a hormônio (LSH), que remove o ácido graxo do carbono 1 e/ou do carbono 3 do TAG. A ativação de enzima LSH depende da sua fosforilação que é feita pela PKA. Logo o processo de lipólise nos adipócitos, assim como a glicogenólise em hepatócitos, também depende do aumento na concentração de AMPc. Nos adipócitos esse aumento ocorre quando algum hormônio (normalmente a adrenalina) liga-se ao receptor  $\beta$  na membrana celular e ativa a adenilato ciclase (CHAMPE e cols. 2009). O glicerol liberado durante a degradação de TAG pode ser fosforilado nos adipócitos, formando glicerol-3-fosfato (G3P) que será usado para a reesterificação dos ácidos graxos livres (MORENO; BRITO, 2012). O glicerol também pode ser transportado pela circulação sanguínea ao fígado, onde poderá ser fosforilado. O G3P resultante pode ser utilizado para sintetizar TAG no fígado ou ser convertido em DHAP (diidroxiacetonafosfato) pela reversão da reação da enzima glicerol-fosfato-desidrogenase. A DHAP pode participar na glicólise ou na gliconeogênese (CHAMPE e cols. 2009).

A adrenalina assim como todas as demais monoaminas e algumas outras moléculas (GABA e acetilcolina) largamente conhecidas por agirem como hormônios ou neurotransmissores em vertebrados foram identificados em crustáceos com o uso de técnicas imunocitoquímicas, eletroforese e HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (FINGERMAN e NAGABHUSHANAM, 1992; FINGERMAN et al, 1994; KUO et al, 1995). Vários estudos demonstraram que as monoaminas são distribuídas pelo sistema nervoso dos

crustáceos e têm uma grande quantidade de efeitos fisiológicos (CHENG et al., 2006), podendo agir como neuroreguladores (neurotransmissores e neuromoduladores) ou hormônios (FINGERMAN, NAGABHUSHNAM, 1992; ELOFFSON et al., 1982; KUO, YANG, 1999).

O aumento na concentração de catecolaminas e de hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (CRH, ACTH e glicocorticoides) é considerado uma resposta primária ao estresse em vertebrados. Estes hormônios causam, entre outros efeitos, aumento da glicemia, o que é considerado uma resposta secundária ao estresse (KUO E YANG, 1999; APARICIO-SIMÓN et al., 2010). A elevação nos níveis de catecolaminas seguida por elevação na glicemia também foi descrita em algumas espécies de crustáceos que foram expostas a agentes estressores (KUO, YANG, 1999; APARICIO-SIMÓN et al., 2010). Aparicio-Simón et al. (2010), em um estudo realizado com o camarão *Litopenaeus vannamei*, verificaram que após 10 minutos de exposição a um agente estressor, os níveis de adrenalina e de noradrenalina na hemolinfa e no hepatopâncreas aumentam, enquanto os níveis destas catecolaminas reduziram no pedúnculo ocular. Estas alterações na concentração de catecolaminas nos tecidos foram seguidas por elevações nos níveis de glicose e de lactato na hemolinfa destes camarões. Desta forma, assim como em vertebrados, a hiperglicemia também é considerada uma resposta secundária ao estresse em crustáceos (KUO e YANG, 1999; APARICIO-SIMÓN et al., 2010).

Uma das ações já descrita para algumas monoaminas é o controle da secreção do hormônio hiperglicêmico de crustáceos (CHH) (KUO e YANG, 1999; LORENZON et al., 2005). O CHH é considerado o principal hormônio controlador do metabolismo de carboidratos em crustáceos. Ele é produzido principalmente no órgão X e armazenado na glândula do Seio, estruturas neuroendócrinas localizados nos pedúnculos oculares destes animais (FANJUL-MOLES, 2006). Este hormônio também pode ser sintetizado em outros locais, como o órgão pericárdico, o sistema nervoso ventral e o intestino, porém o CHH intestinal é considerado uma forma variante do hormônio produzido no pedúnculo ocular e acredita-se que ele não está envolvido no controle do metabolismo de carboidratos (FANJUL-MOLES, 2006). Além do CHH outros hormônios são produzidos no órgão X, como o hormônio inibidor da muda, o hormônio inibidor da vitelogênese, e o hormônio inibidor do órgão mandibular (OLLIVAUX et al., 2006). Com a finalidade de estimular a reprodução dos crustáceos, muitos criatórios comerciais realizam o procedimento de apedunculacão, que consiste na remoção bilateral dos pedúnculos oculares, assim não há mais a produção do

hormônio inibidor da vitelogênese. Este procedimento pode, ao retirar a principal fonte de CHH dos animais, causar hipoglicemia (SATHYANANDAM et al., 2008). Estudos no caranguejo *Neohelice granulata* demonstram redução nos valores de glicose na hemolinfa após a remoção dos pedúnculos oculares (SANTOS et al., 1988; ZANOTELLI et al., 2002).

Vários estudos em crustáceos descrevem hiperglicemia após injeções de adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina e melatonina (LÜSCHEN et al., 1993; KUO e YANG, 1999; ZANOTELLI et al., 2002; SAINATH e REDDY, 2010; INOHARA et al., 2015). Como estas moléculas também podem agir como neuromodulares e estimular a secreção de CHH pelo pedúnculo ocular, alguns autores sugerem que o efeito hiperglicemiante das monoaminas é, na verdade, um efeito indireto, pela ação do CHH (SAINATH e REDDY, 2010; LEE et al., 2001). Para verificar se a ação hiperglicemiante das monoaminas é direta ou indireta foram realizados estudos em animais apedunculados e intactos (VINAGRE, 1999; APARÍCIO-SIMÓN, 2010).

Quando expostos a temperaturas reduzidas (estresse térmico), lagostins *Macrobrachium rosenbergii*, intactos e apedunculados, desenvolvem hiperglicemia (KUO e YANG (1999). Estes autores também compararam o efeito da administração de serotonina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e octopamina. Todas estas moléculas causaram hiperglicemia nos animais intactos, sendo o efeito da serotonina o mais potente. Nos animais apedunculados, apenas a octopamina e a noradrenalina apresentaram efeito hiperglicêmico significativo. Hsieh et al (2006) confirmaram a hiperglicemia descrita por Kuo e Yang (1999) após a exposição dos lagostins *M. rosenbergii* intactos e apedunculados ao estresse pelo frio, porém desta vez eles verificaram também que a elevação na glicemia é acompanhada por elevações nos níveis de catecolaminas no gânglio torácico, o que sugere um aumento na síntese destas moléculas. No mesmo estudo verificou-se que a administração de antagonistas do receptor  $\alpha$  (fentolamina e prazosina) e do receptor  $\beta$  (propranolol e metoprolol) causam redução no efeito hiperglicemiante ocasionado pelo estresse. A incubação do hepatopâncreas em presença de noradrenalina causou um aumento na secreção de glicose, sugerindo uma ação direta dela sobre o hepatopâncreas (HSIEH et al., 2006). Conforme já descrito em vertebrados, os receptores das monoaminas podem causar elevações nos níveis de AMPc e este, por sua vez, pode estimular a glicogenólise. A glicogenólise hepatopancreática e/ou de outras estruturas seria uma provável explicação para um efeito direto das monoaminas em crustáceos, aumentando a glicemia (HSIEH et al., 2006).

No caranguejo *N. granulata*, a administração de serotonina causou efeito hiperglicemiante dose-dependente tanto em animais intactos como apedunculados, alimentados com a dieta rica em proteínas (RP) ou com a dieta rica em carboidratos (RC) (ZANOTELLI et al., 2002). O efeito hiperglicêmico da serotonina em *N. granulata* foi confirmado por Santos et al (2001) e Inohara et al. (2015) em animais intactos. Foi constatado que este efeito também poderia ser observado após a administração de fluoxetina, inibidor da recaptura de serotonina em terminais sinápticos (SANTOS et al , 2001).

O caranguejo *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Brachyura) anteriormente denominado *Chasmagnathus granulatus*, vive em estuários de sedimento areno-lodoso, desde o Rio de Janeiro, no Brasil, até o Golfo de São Martin, na Argentina (BIANCHINI et al, 2008). Populações numerosas são encontradas na região estuarina de Tramandaí e no estuário da Lagoa dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (MELO, 1999). Eles possuem importantes papéis tanto nas relações ecológicas quanto em aspectos ambientais, sendo os principais responsáveis pela retenção de matéria orgânica e pela transferência energética em seu habitat (BIANCHINI et al, 2008). Os animais desta espécie são considerados “engenheiros ambientais”, pelo seu comportamento típico de cavar tocas, atividade que tem grande impacto na composição dos sedimentos do solo. Este comportamento é considerado muito importante para o ecossistema, pois promove o aumento na drenagem e na aeração do solo, retêm pesticidas organoclorados, afeta os organismos bentônicos, a distribuição e a quantidade de formas juvenis de peixes e o forrageamento de roedores (SPIVAK, 2010).

O *N. granulata* pode ser considerado um modelo animal emergente. Ele possui características muito úteis para o estudo de questões específicas, especialmente processos fisiológicos adaptativos (SPIVAK, 2010). Este caranguejo está constantemente exposto a um grande número de desafios ambientais tais como mudanças na temperatura, pressão parcial de oxigênio ambiental, disponibilidade e composição de alimentos e alterações na salinidade, de acordo com cada estação do ano (KUCHARSKI e DA SILVA, 1991). Por se adaptar as diversas alterações do seu ambiente, que é exatamente uma transição do meio marinho para o estuarino, e ter hábitos semiterrestres, o *N. granulata* também é considerado um bom modelo para o estudo de transições evolutivas (SPIVAK, 2010). Esta espécie adapta-se muito bem às condições de cativeiro, tendo sido utilizado como modelo biológico para o estudo do metabolismo de crustáceos.

## 1.1 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo verificar se a adrenalina apresenta efeitos sobre o metabolismo de carboidratos e lipídeos do caranguejo *N. granulata*. Pretende-se elucidar de que forma ela regula o metabolismo intermediário do animal, seus efeitos sobre tecidos periféricos e como esses efeitos se relacionam a alterações sistêmicas já conhecidas, como por exemplo, a hiperglicemia.

### 1.1.1 Objetivos/Metas específicos

- a) Meta 1: verificar o efeito de injeções de adrenalina sobre a glicemia, a concentração de triglicerídeos na hemolinfa e a concentração de glicogênio no hepatopâncreas, músculo, brânquias anteriores e brânquias posteriores;
- b) Meta 2: verificar o efeito *in vitro* da adrenalina sobre a glicogenólise, lipólise e oxidação de glicose no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Caranguejos *N. granulata* machos, em período de intermuda, foram capturados durante a primavera e o verão (2012 a 2015), na margem leste da Lagoa de Tramandaí, no município de Imbé/RS (licença do IBAMA, número 39062-1). O ambiente do local é tipicamente estuarino, influenciado tanto pelas águas do oceano Atlântico como pelo sistema lagunar de Tramandaí (WÜRDIG, 1984).

Após a captura, realizada manualmente, os animais eram acondicionados em caixas plásticas, contendo água do próprio local, e transportados até o Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), UFRGS, em Porto Alegre/RS.

No LaMEC, os animais eram submetidos ao choque hiposmótico com água destilada por 24 horas, para limpeza do conteúdo estomacal e eliminação de possíveis parasitas (KUCHARSKI, 1990). Após este período, os animais eram transferidos e mantidos em um tanque contendo água com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante. Os caranguejos eram alimentados, *ad libitum*, com carne bovina crua, três vezes por semana.

### 2.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para a realização dos experimentos, os animais selecionados do tanque eram transferidos para aquários, com as mesmas condições descritas anteriormente, e alimentados *ad libitum* com carne bovina crua (dieta rica em proteínas - RP) ou arroz cozido (dieta rica em carboidratos - RC) diariamente, durante um período de aclimação de 15 dias. Após este período, iniciavam-se os procedimentos específicos para cada experimento.

## 2.3 ESTUDOS “*IN VIVO*”

### **2.3.1 Curva de tempo para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos**

Para este estudo foram utilizados animais em dieta RC (n 30) e RP (n 30). Os experimentos foram realizados após o período de aclimação. No dia de cada experimento, foram coletadas amostras de hemolinfa dos animais no início da manhã, os caranguejos foram transferidos para tubos de PVC numerados para a posterior identificação de cada indivíduo. Após 3h, os caranguejos receberam injeções de adrenalina (10 mM) ou de solução fisiológica para crustáceos, e após 15, 30, ou 60 minutos amostras de hemolinfa foram coletadas para dosagem dos níveis de glicose e de triglicerídeos.

A adrenalina foi diluída em solução fisiológica para crustáceos (SFC: NaCl 300mM, KCL 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, CaCl<sub>2</sub> 25mM e H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 8,8mM) preparada com o pH 7,8, ajustado com tampão Tris(0,1M) - HCl(6N), pH8,0 e NaOH 1N e ácido ascórbico (0,1g/L). Estes compostos, a solução Ringer e os demais reagentes foram mantidos constantemente sob refrigeração. Foram injetados 100µl de solução na base do quelípede direito de cada caranguejo.

Para a coleta das amostras de hemolinfa, foram utilizadas seringas descartáveis de 1ml (tipo insulínica) com adição de 10µl de Oxalato de Potássio 10% para cada 100µl de hemolinfa para evitar a coagulação. Após a coleta, as amostras de hemolinfa foram transferidas para tubos plásticos tipo Eppendorf (capacidade para 1,5ml, fundo cônico) e congeladas até o dia da dosagem.

### **2.3.2 Curva de dose para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos e a concentração de glicogênio tecidual**

Para este estudo foram utilizados animais em dieta RC (n 25) ou RP (n 25). Os experimentos foram realizados após o período de aclimação. No dia de cada experimento, foram coletadas amostras de hemolinfa dos animais no início da manhã, os caranguejos foram transferidos para tubos de PVC numerados para a posterior identificação de cada indivíduo.

Após 3h, os caranguejos receberam injeções de adrenalina (0,001mM, 0,01mM, 0,1mM ou 1mM) ou de solução fisiológica para crustáceos e 60 minutos após foram coletadas amostras de hemolinfa para dosagem dos níveis de glicose. No final do período experimental, os animais foram crioanestesiados e sacrificados para obtenção de amostras de hepatopâncreas, de muscular mandibular, das brânquias anteriores e das brânquias posteriores, nos quais se realizou análise da concentração de glicogênio. A SFC e a coleta de amostras de hemolinfa foram feitas conforme descrito.

## 2.4 ESTUDOS “*IN VITRO*”

### **2.4.1 Curva de tempo para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.**

Após os 15 dias de dieta RP (n 16) e RC (n10), os animais foram crioanestesiados e o hepatopâncreas as brânquias anteriores e as brânquias posteriores foram retirados para a realização do experimento. Estes tecidos foram colocados em tubos de plástico que continham 1 ml de SFC, aerados com carbogênio, uma mistura de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5 v/v), por 20 segundos, pré-incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante, a 25°C durante 15 minutos. Após este procedimento, os tecidos eram retirados dos tubos, secos em papel filtro e colocados em frascos de plástico identificados contendo 1ml de SFC (controle) ou 1ml de SFC com 2,5mM de adrenalina e 0,1M de ácido ascórbico. Os tecidos foram novamente aerados com carbogênio por 20 segundos e incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante, a 25°C durante 15, 30 ou 60 minutos. Após a incubação as concentrações de glicose e de glicerol foram determinadas nos meios e correlacionadas com o peso dos tecidos (REYNISDOTTIR e cols., 1994; PEDERSEN e cols., 2004; SANTOS e cols., 2012).

### **2.4.2 Curva de dose para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.**

Neste experimento, após os períodos de aclimação e dieta, os caranguejos (RC n 15; RP n 15) foram crioanestesiados e o hepatopâncreas as brânquias anteriores e as brânquias



posteriores retirados. Estes tecidos foram colocados em tubos de plástico que continham 1 ml de SFC, aerados com carbogênio por 20 segundos, pré-incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante, a 25°C durante 15 minutos. Após este procedimento, os tecidos eram retirados dos tubos, secos em papel filtro e colocados em novos frascos de plástico identificados contendo 1ml de SFC e diferentes doses de adrenalina, formando 6 grupos experimentais: 1) controle (sem hormônio); 2) adrenalina na dose de  $10^{-7}$ M e ácido ascórbico 0,1M; 3) adrenalina na dose de  $10^{-6}$ M e ácido ascórbico 0,1M; 4) adrenalina na dose de  $10^{-5}$ M e ácido ascórbico 0,1M; 5) adrenalina na dose de  $10^{-4}$ M e ácido ascórbico 0,1M; 6) adrenalina na dose de  $10^{-3}$ M e ácido ascórbico 0,1M. Os tecidos foram novamente aerados com carbogênio por 20 segundos e incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante, a 25°C durante 30 minutos (REYNISDOTTIR e cols., 1994; PEDERSEN e cols., 2004; HSIEH e cols., 2006; SANTOS e cols., 2012). Após este período, foram determinadas e correlacionadas com o peso dos tecidos, as concentrações de glicose e de glicerol nos meios de incubação e de glicogênio nos tecidos.

#### **2.4.3 Efeito da adrenalina sobre a oxidação de $^{14}$ C-glicose em brânquias anteriores, brânquias posteriores e hepatopâncreas.**

Após o período de aclimatação os animais (RC n 20; RP n 20) foram crioanestesiados e amostras de hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores foram coletadas e colocados em frascos de vidro com tampa de borracha contendo 1 mL de ringer, acrescido de  $0,15\mu\text{Ci}$  de  $^{14}\text{C}$  de [U- $^{14}\text{C}$ ]-glicose (55 mCi/mmol GE-Healthcare) e 5mM glicose na presença de adrenalina ( $10^{-4}$ M) e ácido ascórbico. Foram colocadas tampas de borracha acopladas a vidros em formato de “J” com um poço onde será colocado papel 3MM para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  resultante da oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose. Os tecidos foram aerados com carbogênio por 30 segundos e as tampas, posteriormente, fechadas e vedadas com Parafilm. Os tecidos foram incubados durante 60 minutos, a 25°C sob agitação constante em banho metabólico. A reação de oxidação foi interrompida injetando-se no meio de incubação 0,25 mL de TCA 50%. A captação do  $^{14}\text{CO}_2$  foi iniciada injetando-se 0,25 mL de NaOH 2 M nos poços, os dois reagentes (TCA e NaOH) foram injetados nos meios através da tampa de borracha. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 24 horas para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  formado. Após este período, os papéis 3MM foram retirados dos vidros em formato de “J” e colocados em frascos de contagem com 2 ml do líquido de cintilação [Tolueno – Triton

X100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e levados a um contador LKB-Wallac, que detecta a radiação emitida pelos radioisótopos através de *software* que quantifica o valor da concentração obtida em função do sinal em contas por minuto (cpm) (PELLEGRINO, 2011).

## 2.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As concentrações de glicose, de triglicerídeos e de glicerol nas amostras de hemolinfa e nos meios de incubação foram determinadas com *kits* comerciais para análises com espectrofotômetro, rotineiramente utilizados em bioquímica clínica. Os resultados de glicemia e triglicerídeos foram expressos em mg/dL, os resultados da concentração de glicerol foram expressos em mmol/L

A extração de glicogênio nas amostras de tecidos foi feita segundo o método de van Handel (1965). Após a extração realizou-se a hidrólise ácida das amostras conforme técnica de Geary et al (1981), a concentração de glicogênio foi determinada pela concentração de glicose liberada, utilizando a metodologia descrita acima.

## 2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ( $\pm$ ) erro padrão da média (EPM). Foram utilizados “testes t” para amostras independentes e análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme o objetivo do experimento, seguida do pós-teste de Tukey e de Bonferroni, realizados com o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) (versão 13.0) compatível com Windows 2007. Antes de realizar o teste de ANOVA foi verificada a normalidade (teste de Kolgorof-Smirnof) e a homogeneidade (teste de Levene) dos dados. Na ausência da homogeneidade, os dados foram transformados matematicamente antes da realização do teste de ANOVA. Os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ .

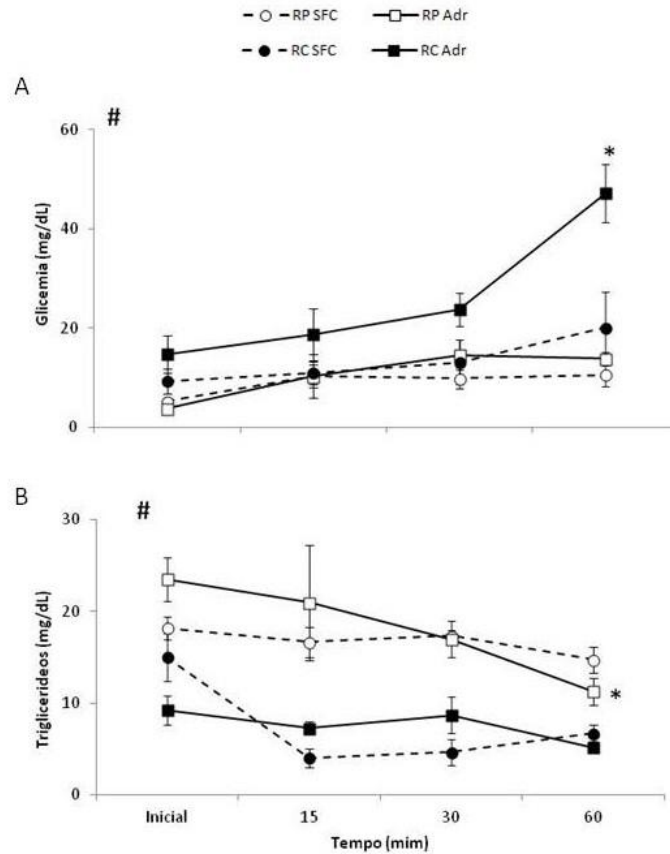
### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ESTUDOS “*IN VIVO*”

##### 3.1.1 Curva de tempo para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos

Os resultados da administração de adrenalina 10mM, em diferentes tempos, sobre a concentração de glicose e de triglicerídeos na hemolinfa de caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta RC e RP estão na figura 3. A dieta dos animais induziu diferença significativa na glicemia e na concentração hemolinfática de TAG ( $p<0,05$ ). Os valores de glicose foram mais elevados nos animais alimentados com a dieta RC, enquanto a concentração de TAG foi mais elevada nos caranguejos RP. No tempo 60 minutos houve aumento ( $p<0,05$ ) da glicemia no grupo adrenalina RC (Figura 3A), e aumento ( $p<0,05$ ) nos triglicerídeos circulantes no grupo adrenalina RP (Figura 3B).

Figura 3 - Efeito da administração de 10 mM de adrenalina sobre a concentração hemolinfática de glicose (A) e triglicerídeos (B), em caranguejos *N. granulata*. Os resultados estão expressos em mg/dL. Tratamentos: ○ ringer RP, ● ringer RC, □ adrenalina RP e ■ adrenalina RC. As barras representam  $\pm$  o erro padrão da média. \* representa diferença significativa em relação aos demais tempos do mesmo tratamento ( $P < 0,05$ ). # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.

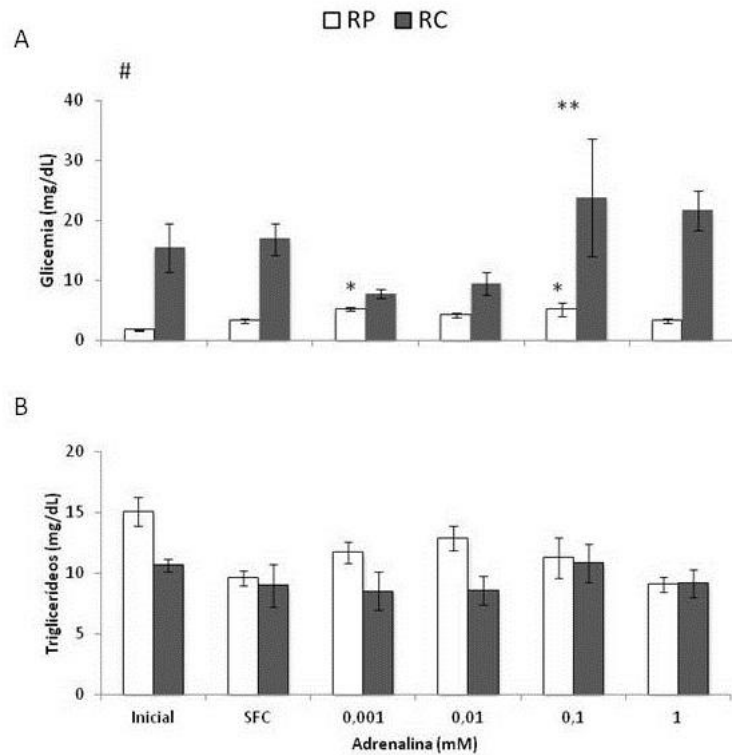


### 3.1.2 Curva de dose para o efeito de injeções de adrenalina sobre parâmetros bioquímicos hemolinfáticos e a concentração de glicôgeno tecidual

Os resultados obtidos 60 minutos após a administração de doses crescentes de adrenalina sobre a concentração de glicose e de triglicerídeos na hemolinfa de caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta RC e RP estão na figura 4. A dieta dos animais induziu diferença significativa na glicemia ( $p < 0,05$ ), sendo os valores mais elevados nos animais alimentados com a dieta RC. A adrenalina nas doses de 0,001 e 0,1mM aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a glicemia de caranguejos alimentados com a dieta RP (Figura 4A) em relação aos valores iniciais. Nos animais RC a adrenalina não causou mudança significativa na glicemia ( $p > 0,05$ ). Analisando juntos os resultados das duas dietas, por ANOVA de 2 vias, os animais que receberam a dose de 0,1mM apresentaram níveis glicêmicos significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) (Figura 4A). A concentração de triglicerídeos

na hemolinfa dos caranguejos não foi significativamente ( $p>0,05$ ) alterada com as diferentes dietas nem com as injeções de adrenalina (Figura 4B).

Figura 4- Efeito da administração de adrenalina em diferentes doses sobre a concentração hemolinfática de glicose (A) e triglicéridos (B), em caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (RP – colunas brancas) ou rica em carboidratos (RC – colunas pretas). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM. \* representa diferença significativa ( $p<0,05$ ) em relação aos demais tratamentos na ANOVA de uma via. \*\* representa diferença significativa ( $p<0,05$ ) em relação à dose 0,001mM na ANOVA de duas vias. # representa diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as dietas.



A concentração de glicogênio tecidual nas brânquias anteriores (Figura 5A) e nas brânquias posteriores (Figura 5B) não variou de forma significativa ( $p>0,05$ ) em função das dietas, nem da exposição à adrenalina. Nos animais RP a dose 0,001mM de adrenalina causou redução significativa ( $p<0,05$ ) na concentração de glicogênio no músculo mandibular (Figura 6A) e no hepatopâncreas (Figura 6B). Nos animais RC nenhuma dose de adrenalina causou alteração significativa ( $p>0,05$ ) na concentração de glicogênio no hepatopâncreas ou no músculo mandibular.

Figura 5- Efeito da administração de adrenalina em diferentes doses sobre a concentração de glicogênio nas brânquias anteriores (A) e nas brânquias posteriores (B) de caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (RP – colunas brancas) ou rica em carboidratos (RC – colunas pretas). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM.

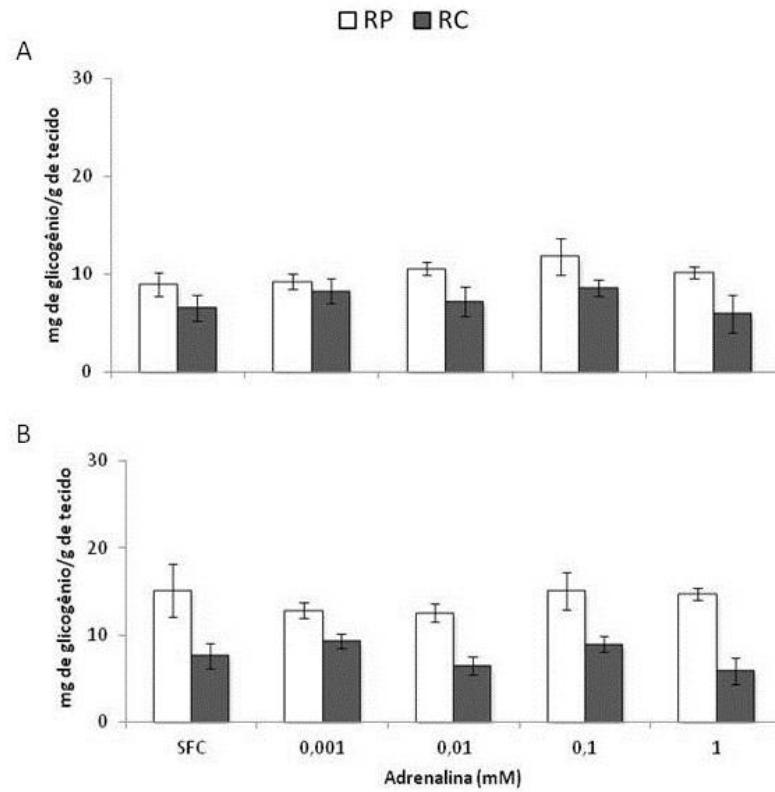
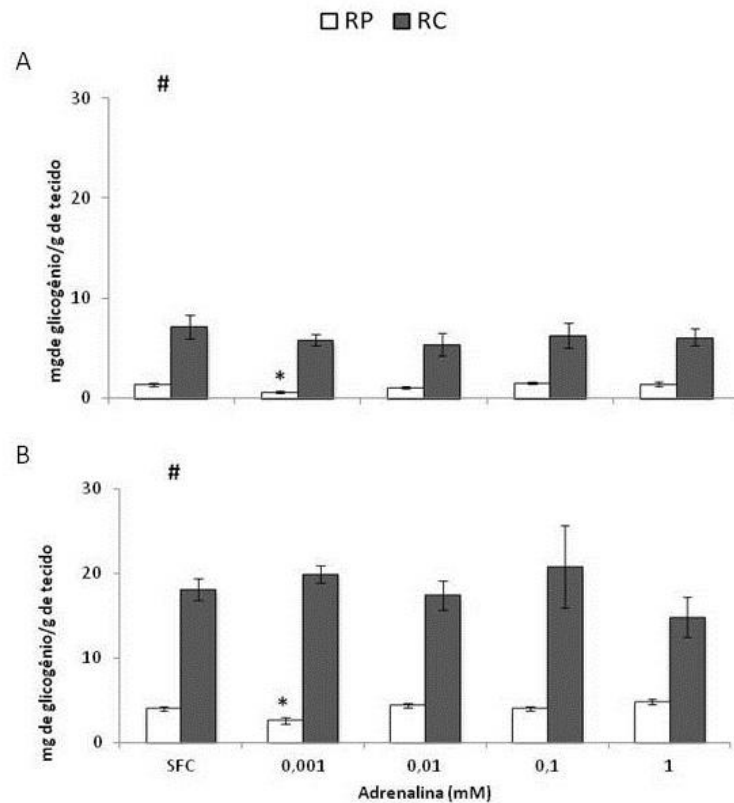


Figura 6- Efeito da administração de adrenalina em diferentes doses sobre a concentração de glicogênio no hepatopâncreas (A) e no músculo mandibular (B) de caranguejos *N. granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (RP colunas brancas) ou rica em carboidratos (RC - colunas pretas). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM. \* representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais tratamentos. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.



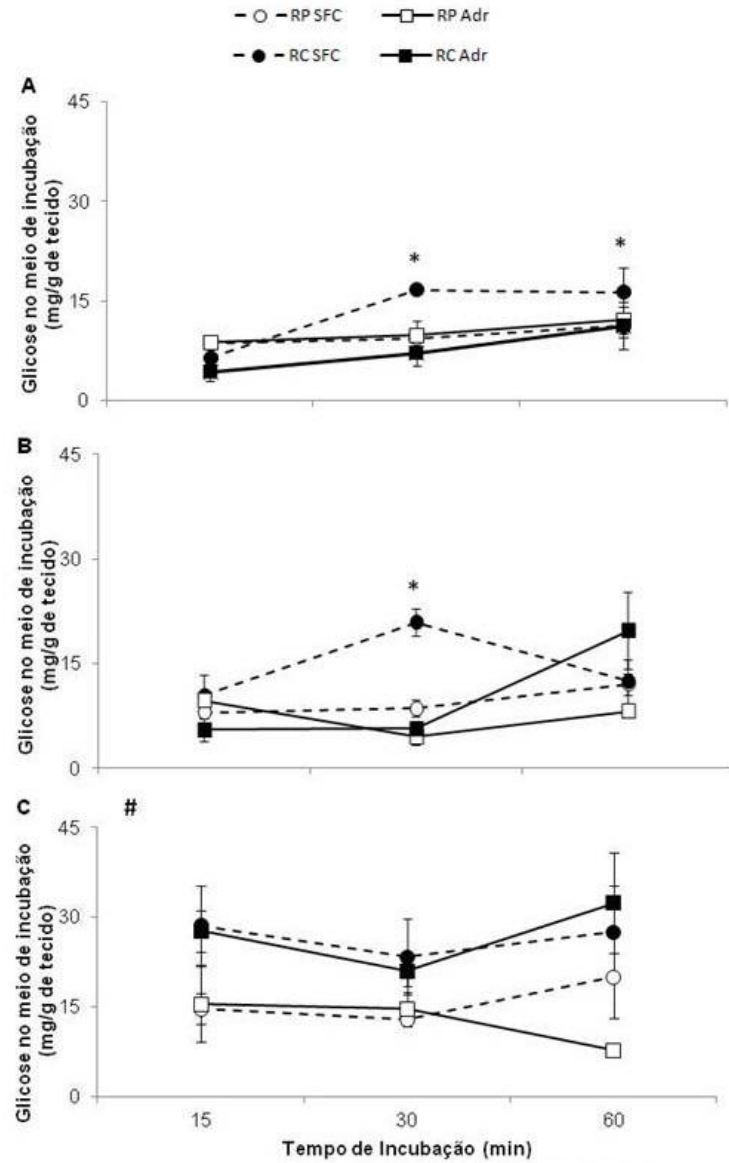
### 3.2 ESTUDOS “*IN VITRO*”

#### 3.2.1 Curva de tempo para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.

Nas brânquias anteriores dos animais alimentados com dieta RC a liberação de glicose foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior nos tempos 30 e 60 minutos em relação ao tempo 15 minutos (Figura 7A) e também foi maior no grupo ringer comparado ao grupo adrenalina. No grupo alimentar RP não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Nas brânquias posteriores dos animais alimentados com dieta RC a liberação de glicose foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior no tempo 30 minutos em relação aos tempos 15 e 60 minutos (Figura 7B). Nas brânquias posteriores de animais RP não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

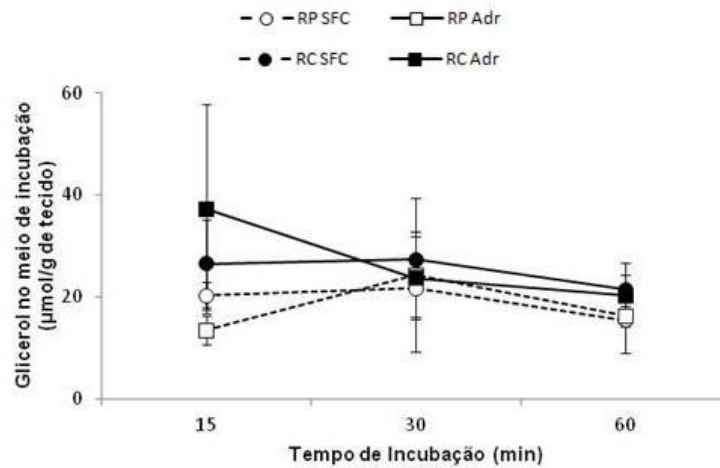
Figura 7 - Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a liberação de glicose para o meio de incubação de brânquias anteriores (A), de brânquias posteriores (B) e de hepatopâncreas (C) de *Neohelice granulata*. Os resultados estão expressos em mg/dL. Tratamentos: ○ ringer RP, ● ringer RC, □ adrenalina (2,5mM) RP e ■ adrenalina (2,5mM) RC. As barras representam  $\pm$  o erro padrão da média. \* representa diferença significativa entre em relação aos 15 minutos ( $P < 0,05$ ). # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.



No hepatopâncreas não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre tempos ou tratamentos (adrenalina e controle) na ação da adrenalina sobre a liberação de glicose (Figura 7C) e de glicerol para o meio de incubação (Figura 8).



Figura 8 - Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a liberação de glicerol para o meio de incubação de hepatopâncreas de *Neohelice granulata*. Os resultados estão expressos em mg/dL. Tratamentos: ○ ringer RP, ● ringer RC, □ adrenalina (2,5mM) RP e ■ adrenalina (2,5mM) RC. As barras representam  $\pm$  o erro padrão da média. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.

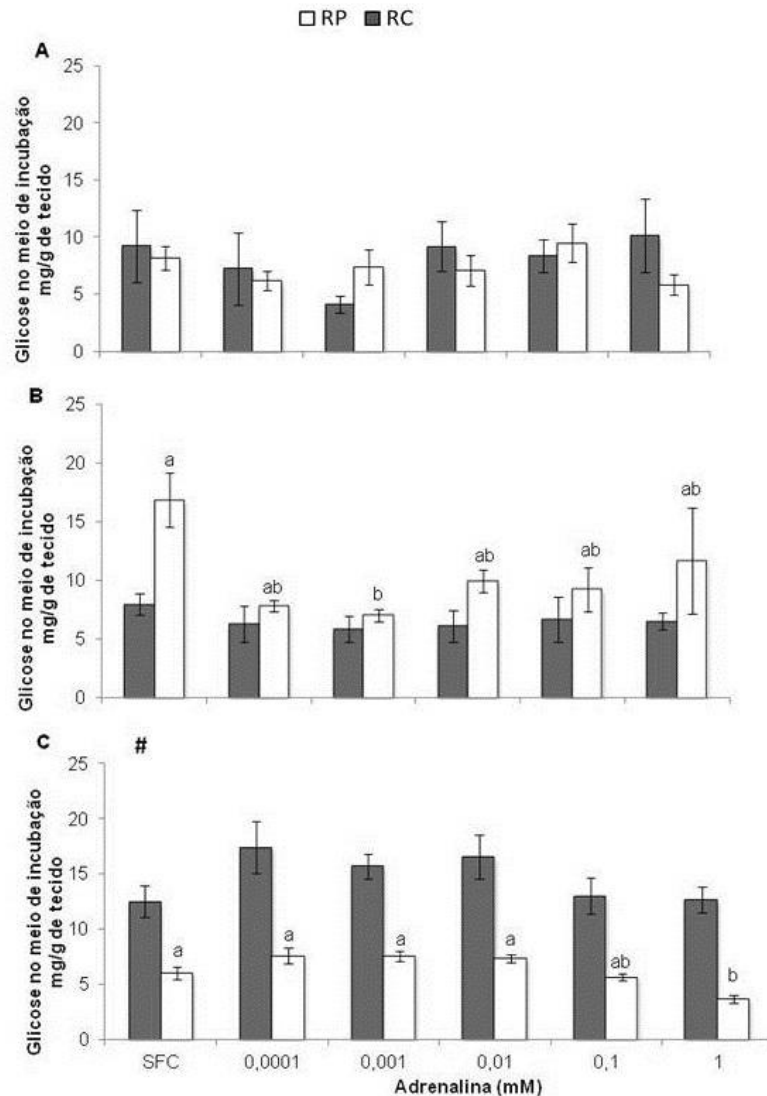


### 3.2.2 Curva de dose para ação da adrenalina sobre glicogenólise e lipólise no hepatopâncreas, brânquias anteriores e brânquias posteriores.

Nos meios em que foram incubadas as brânquias anteriores, tanto de animais RP quanto RC, não se verificou nenhuma alteração significativa ( $p > 0,05$ ) na concentração de glicose (Figura 9A). A concentração de glicogênio desse tecido também não variou ( $p > 0,05$ ) com a incubação com adrenalina ou por efeito da dieta (Figura 11A).

Nos meios em que foram incubadas brânquias posteriores de animais RP a adrenalina, na dose  $10^{-6}$ M causou diminuição significativa ( $p < 0,05$ ), em comparação ao grupo controle, na concentração de glicose (Figura 9B). Nas outras doses, os valores obtidos foram intermediários entre os do grupo SFC e a dose  $10^{-6}$ M. No grupo RC não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). A concentração de glicogênio nas brânquias posteriores não variou ( $p > 0,05$ ) com a incubação com adrenalina ou por efeito da dieta (Figura 11B).

Figura 9 - Efeito de diferentes doses de adrenalina na liberação de glicose para o meio de incubação de brânquias anteriores (A), de brânquias posteriores (B) e de hepatopâncreas (C) de *Neohelice granulata*. As colunas brancas representam o grupo alimentar RP e as colunas cinza, o grupo RC. As barras representam  $\pm$  o erro padrão da média. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.



Nos meios em que foram incubadas amostras de hepatopâncreas de animais RP a concentração de glicose foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) no grupo adrenalina  $10^{-3}$ M do que no grupo controle, obtendo-se valores intermediários na dose  $10^{-4}$ M (Figura 9C). Nas outras doses e no grupo RC não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). A concentração de glicerol não variou significativamente ( $p > 0,05$ ) com nenhum dos tratamentos ou dietas (Figura 10). A concentração de glicogênio no hepatopâncreas, assim como nas brânquias anteriores e posteriores (Figura 11), não variou ( $p > 0,05$ ) com a incubação com adrenalina, mas foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no grupo RC (Figura 11C).

Figura 10 - Efeito de diferentes doses de adrenalina na liberação de glicerol para o meio de incubação de hepatopâncreas de *Neohelice granulata*. As colunas brancas representam o grupo alimentar RP e as colunas cinza, o grupo RC; as barras representam  $\pm$  o erro padrão da média.

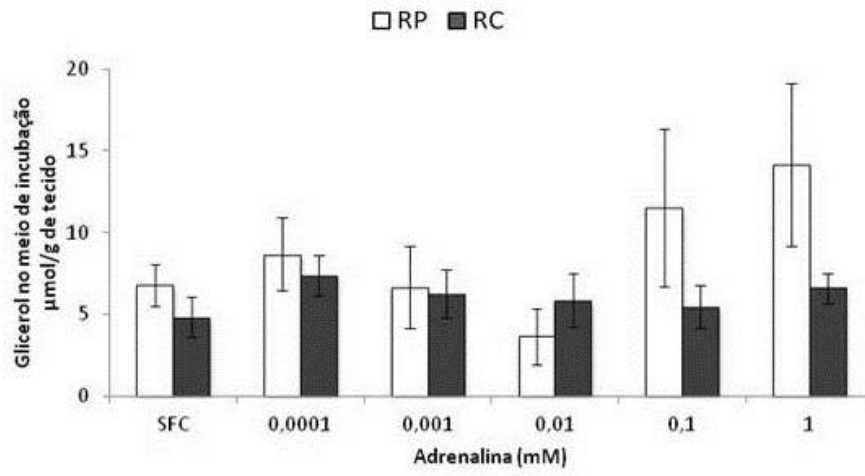
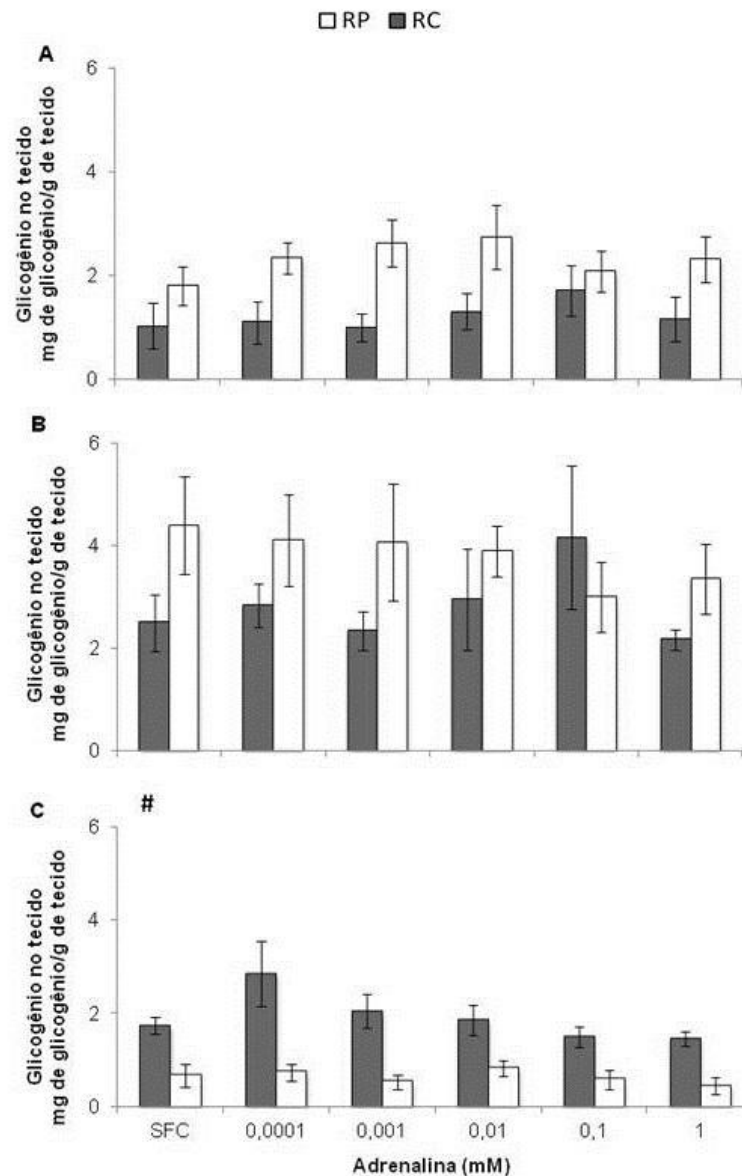


Figura 11- Efeito de diferentes doses de adrenalina na concentração de glicogênio em brânquias anteriores (A), brânquias posteriores (B) e hepatopâncreas (C) de *Neohelice granulata* após 30 minutos de incubação. As colunas brancas representam o grupo alimentar RP e as colunas cinza, o grupo RC. As barras representam  $\pm$  o erro padrão da média. # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.

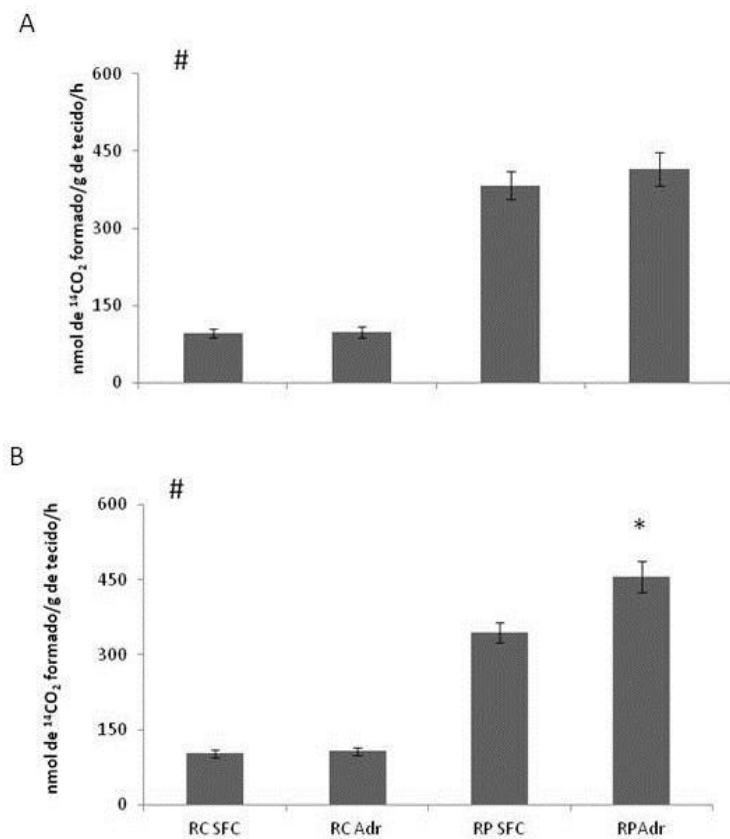


### 3.2.3 Efeito da adrenalina sobre a oxidação de $^{14}\text{C}$ -glicose em brânquias anteriores, brânquias posteriores e hepatopâncreas.

Nas brânquias anteriores a adrenalina não causou alteração significativa na oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose ( $p > 0,05$ ). Porém nas brânquias anteriores dos animais RP a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que nos animais RC (Figura 12A). Nas brânquias posteriores (Figura 12B) a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no grupo adrenalina RP do que nas amostras controle da mesma dieta. Nas amostras do grupo RC não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Assim como nas

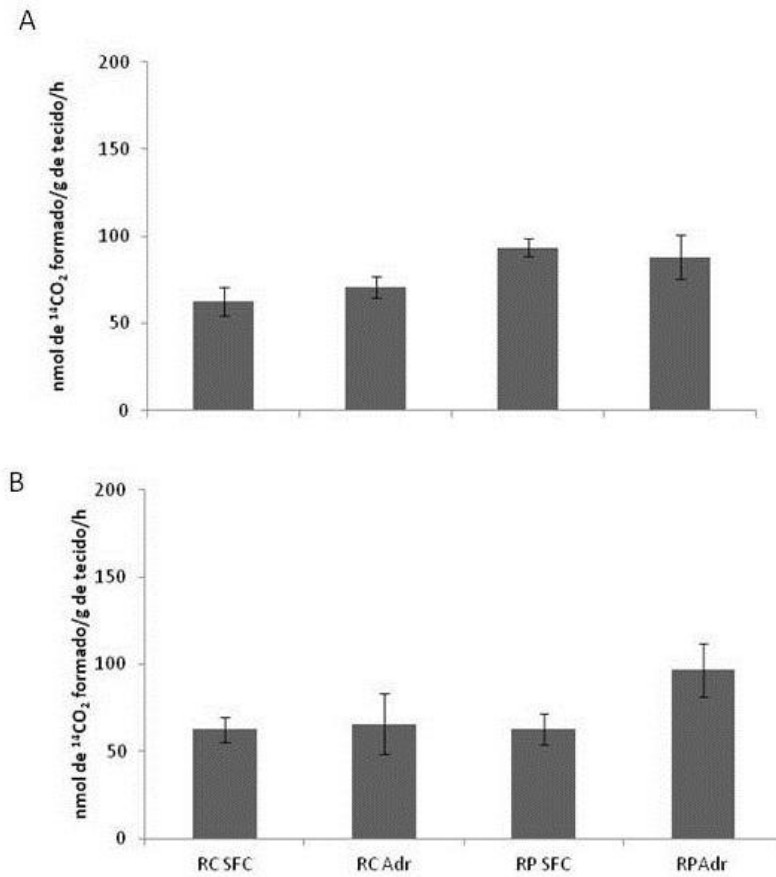
brânquias anteriores, nas posteriores a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nas amostras de caranguejos RP do de RC (Figura 12B).

Figura 12 - Efeito da adrenalina (dose) sobre a oxidação de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  glicose em amostras de brânquias anteriores (A) e brânquias posteriores (B) de *Neohelice granulata*, após 60 minutos de incubação. Resultados expressos em nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  formado por grama de tecido por hora de incubação. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média, respectivamente. \* representa diferença significativa entre as médias em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). # representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas.



A adrenalina não induziu alterações significativas ( $p > 0,05$ ) na oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose no hepatopâncreas e no músculo do mandibular de animais alimentados com dieta RP ou RC (Figura 13A e B). Diferentemente do que ocorreu nas brânquias anteriores e posteriores não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose entre os grupos alimentares.

Figura 13 - Efeito da adrenalina (dose) sobre a oxidação de [U- $^{14}\text{C}$ ] glicose em amostras de hepatopâncreas (A) e músculo mandibular (B) de *Neohelice granulata*, após 60 minutos de incubação. Resultados expressos em nmoles de  $^{14}\text{CO}_2$  formado por grama de tecido por hora de incubação. As colunas e barras representam as médias  $\pm$  erro padrão da média, respectivamente.



## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDOS IN VIVO

Resultados de estudos sobre o metabolismo energético em crustáceos tem demonstrado que fatores hormonais, ambientais e nutricionais influenciam a homeostase da glicose (KUCHARSKI e DA SILVA, 1991; FANJUL-MOLES, 2006). Neste trabalho verificou-se que animais alimentados com dieta RC apresentam a glicemia mais elevada (Figuras 3 e 4) em relação à dieta RP. Os valores de glicogênio no músculo e no hepatopâncreas foram mais elevados nos animais RC do que os animais da dieta RP (Figura 6), enquanto os valores de glicogênio das brânquias não foram alterados pela dieta. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que avaliaram os mesmos parâmetros em *N. granulata* (KUCHARSKI e DA SILVA, 1991; VINAGRE e DA SILVA, 1992; ZANOTELLI et al., 2002; INOHARA et al., 2015).

Os resultados da curva de tempo demonstraram efeito hiperglicemiante em animais RC e lipolítico em animais RP. Porém esses efeitos foram obtidos 60 minutos após a administração de adrenalina, não sendo verificadas alterações em 15 e 30 minutos. Dessa forma, foi escolhido o tempo de 60 minutos para a curva de dose. Como possíveis explicações para este efeito tardio pode-se citar o mecanismo de sinalização de receptores adrenérgicos e a interação da adrenalina com outros hormônios. Os receptores adrenérgicos fazem parte da família dos GPCR. Quando a adrenalina se liga a esses receptores desencadeia (receptores  $\beta$ ) ou inibe (receptores  $\alpha_2$ ) uma cascata de reações que passa pela ativação da adenilato ciclase e formação de AMPc (BENDER e MAYES, 2007; CHAMPE e cols., 2009). Este sistema amplifica o sinal ao longo da cascata, pois cada enzima que é ativada torna ativa mais de uma proteína da próxima etapa (Figura 2). Este mecanismo permite a célula responder a concentrações menores de moléculas sinalizadoras, porém deixa esta resposta mais lenta (BEAR et al., 2002).

Quando a adrenalina foi administrada em doses crescentes, observou-se hiperglicemia na dose 0,001mM em animais RP e de 0,1mM para animais de ambas as dietas. A dose de 0,001mM reduziu as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo apenas de animais RP. Esta redução pode estar relacionada com o aumento na glicemia encontrado após a administração da mesma dose de adrenalina no grupo RP. Desta forma, o efeito

hiperglicemiante da adrenalina não é dose- dependente, e parece ser influenciado pela dieta de manutenção do animal. No camarão *L. vannamei*, o estresse de manipulação causa aumento de adrenalina, seguida de lactato e, finalmente hiperglicemia (APARICIO-SIMÓN e cols., 2010). A administração de adrenalina e de noradrenalina causou hiperglicemia em caranguejos *Carcinus maenas* alimentados com peixe ou carne de porco (dieta equivalente a dieta RP), porém o efeito hiperglicemiante da noradrenalina iniciou 30 minutos após sua aplicação enquanto a ação hiperglicemiante da adrenalina iniciou 1h de sua aplicação e persistiu por mais 1h (LUSCHEN e cols., 1993). Em camarões *Macrobrachium rosenbergii*, o efeito hiperglicemiante foi descrito 30 minutos após a administração de noradrenalina e adrenalina por Kuo e Yang (1999) e foi confirmado por Hsieh et al., (2006). A administração de noradrenalina também causou hiperglicemia em camarões *Litopenaeus vannamei* (YEH e cols., 2006). O efeito hiperglicemiante da adrenalina está relacionado ao aumento na glicogenólise hepática em mamíferos, resultante da ativação de receptores  $\beta$  (BENDER e MAYES, 2007). A redução na concentração de glicogênio nos caranguejos alimentados com dieta RP, sugere a glicogenólise nesse grupo. No grupo RC, é possível que o excesso de carboidratos na dieta possa ter induzido uma redução na sensibilidade às catecolaminas, como descrito em ratos (SANTOS e cols., 2010).

Em humanos, o efeito hiperglicemiante da adrenalina é explicado tanto por ações metabólicas diretas no fígado e no músculo, como por ações indiretas no pâncreas, inibindo a secreção de insulina e estimulando a de glucagon (CRYER, 1995). Hiperglicemia associada à glicogenólise são efeitos clássicos do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) (FANJUL-MOLES, 2006; WEBSTER e cols., 2012). Como as catecolaminas podem agir como neuromodulares e estimular a secreção de CHH pelo pedúnculo ocular, alguns autores sugerem que o efeito hiperglicemiante das monoaminas é, na verdade, um efeito indireto, pela ação do CHH (SAINATH e REDDY, 2010; LEE et al., 2001). Dessa forma, foram testados os efeitos da aplicação de catecolaminas em animais apedunculados. A adrenalina causou hiperglicemia em *C. maenas* (LUSCHEN e cols., 1993) e *M. rosenbergii* (KUO e YANG, 1999) apedunculados. Porém no estudo de Hsieh e cols. (2006), esse efeito não foi confirmado.

Em crustáceos, o hepatopâncreas é o principal local de armazenamento de lipídeos e acumula funções equivalentes às de fígado, tecido adiposo e pâncreas de mamíferos (O'CONNOR e GILBERT, 1968; PELLON-MAISON e cols., 2009). Quando alimentado com dieta RP, os níveis de lipídeos totais no hepatopâncreas de *N. granulata* são superiores



aos dos caranguejos alimentados com dieta RC (KUCHARSKI e DA SILVA, 1991; VINAGRE e DA SILVA, 1992). Ao longo de dois meses de jejum, os níveis de lipídeos totais diminuem progressivamente nos animais previamente alimentados com a dieta RP, enquanto são poupados nos animais que haviam sido alimentados com a dieta RC (Vinagre e Da Silva, 1992). Nesse trabalho, a concentração de triglicerídeos na hemolinfa foi mais elevada nos animais alimentados com dieta RP dos que os da dieta RC (Figuras 3 e 4) e diminuíram 60 minutos após a administração de adrenalina a 10mM. O efeito lipolítico da adrenalina é bem conhecido em mamíferos (REYNISDOTTIR e cols., 1994; PEDERSEN e cols., 2004; SANTOS e cols., 2012; WESTFALL e WESTFALL, 2006), porém ainda não foi descrito em crustáceos. Ratos jovens alimentados com dieta rica em proteínas e pobre em carboidratos (LPRC) durante 15 dias apresentaram aumento na concentração de triglicerídeos no tecido adiposo retroperitoneal (TAR) em relação aos ratos alimentados com ração controle (APARECIDA DE FRANÇA e cols., 2009). Estes resultados foram confirmados por Santos e cols., 2010, que também verificaram que os ratos tratados com a dieta LPRC apresentaram um consumo alimentar 14 % maior, associado ao aumento na captação de lipoproteínas no TAR e diminuição na resposta às catecolaminas (resistência às catecolaminas). Esses resultados sugerem que nos caranguejos do grupo RC, assim como em ratos com dieta LPRC, o excesso de carboidratos na dieta possa ter induzido uma redução na sensibilidade às catecolaminas (SANTOS e cols., 2010).

#### 4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

Devido ao possível envolvimento do CHH na hiperglicemia induzida pela adrenalina, foram realizados estudos *in vitro*, nos quais os tecidos foram pré-incubados apenas com SFC antes da administração de adrenalina nos meios. Esse procedimento tem por objetivo, a dissociação de hormônios e outros possíveis ligantes dos tecidos. Após a pré-incubação, os tecidos foram lavados com SFC e transferidos para vias com diferentes doses de Adrenalina (curva de dose) ou a uma dose única por diferentes tempos (curva de tempo).

No hepatopâncreas, os valores de glicogênio e a secreção de glicose para os meios foram significativamente mais elevados nos animais RC em relação aos RP, evidenciando que o efeito da dieta permanece em condições *in vitro*. A administração de doses crescentes de adrenalina reduziu a secreção de glicose no hepatopâncreas de animais RP e não causaram

alterações significativas na concentração de glicogênio. A oxidação de glicose a CO<sub>2</sub>, não apresentou diferenças quanto às dietas ou pela presença de adrenalina. A redução na secreção de glicose para o meio associada à manutenção dos níveis de glicogênio sugere que provavelmente o efeito hiperglicemiante da adrenalina seja indireto, via CHH. Outra possível explicação para esses efeitos seria a ativação de diferentes receptores simultaneamente ou ainda que a adrenalina não seja o agonista mais efetivo. No camarão *M. rosenbergii*, a secreção de glicose pelo hepatopâncreas para os meios de incubação, elevou-se na presença de adrenalina e de noradrenalina. Quando o hepatopâncreas foi incubado na presença de noradrenalina e prazosina (antagonista  $\alpha_1$ ), a secreção de glicose diminuiu. O mesmo aconteceu na presença de metoprolol (antagonista  $\beta_1$ ), sugerindo o envolvimento de ambos tipos de receptores na glicogenólise nesse camarão (HSIEH e cols., 2006).

No presente trabalho, as brânquias anteriores e posteriores foram estudadas separadamente devido às suas diferenças funcionais: as brânquias anteriores são respiratórias enquanto as posteriores são osmorreguladoras (TRAUSCH e cols., 1989). Assim como no experimento *in vivo*, os valores de glicogênio em ambas as brânquias não sofreram alterações devido às dietas, nem pela presença de adrenalina. Na curva de tempo, a secreção de glicose para os meios de incubação aumentou significativamente em ambas as brânquias. Porém, no experimento onde foram administradas doses crescentes de adrenalina, esse efeito não se repetiu. Nas brânquias anteriores, os valores de glicose no meio se mantiveram constantes, porém, nas posteriores, reduziram na dose 10<sup>-6</sup>M. A oxidação de glicose a CO<sub>2</sub> foi mais elevada nas brânquias do que no músculo e no hepatopâncreas e, nos animais alimentados com a dieta RP do que com a dieta RC em ambas as brânquias. A adrenalina não afetou a oxidação da glicose nas brânquias anteriores, mas a reduziu nas brânquias posteriores de animais RP. Esse aumento na oxidação da glicose nas brânquias posteriores pode ser o responsável pela diminuição na secreção de glicose observada nesse tecido. Provavelmente o alto gasto energético das brânquias posteriores frente ao estresse osmótico pode ser sustentado por um aumento na oxidação da glicose promovido pela secreção de adrenalina. Esses resultados sugerem que a ação da adrenalina é diferente nos dois tipos de brânquias. Estudos de *binding* com serotonina triciada (H<sup>3</sup>-5-HT) revelaram que a ligação era mais intensa nas brânquias posteriores do que nas anteriores, e o emprego de antagonistas serotoninérgicos sugeriu a presença de receptores 5-HT<sub>1-like</sub> e 5-HT<sub>2-like</sub> em ambas as brânquias de *N. granulata*. Dessa forma, seria interessante verificar o envolvimento da adrenalina nas brânquias frente ao estresse osmótico nessa espécie.

Entre os efeitos metabólicos diretos da adrenalina em mamíferos, encontra-se a estimulação da glicogenólise e glicólise muscular, com aumento na secreção de lactato do músculo para a circulação (CRYER, 1995). No presente estudo, a adrenalina não causou alterações significativas na oxidação de glicose no tecido muscular. Assim como no trabalho de Marquese (2004), as dietas não causaram alterações significativas na oxidação da glicose, porém quando o caranguejo *N. granulata* foi exposto à uma hora de anoxia, elevou-se significativamente nos animais previamente alimentados com dieta RC. Por outro lado, a oxidação de glicina é mais elevada em animais RC do que RP e diminui ao longo de três semanas de jejum (PELLEGRINO, 2011). Dessa forma, seria interessante estudar os efeitos da adrenalina sobre o metabolismo muscular frente ao estresse nutricional ou falta de oxigênio.

Em mamíferos, a ação das catecolaminas sobre a lipólise é bem conhecida e avaliada pela liberação de glicerol para os meios de incubação de células, a qual depende do equilíbrio entre os receptores  $\beta$ , lipolíticos, e  $\alpha$ , anti-lipolíticos (REYNISDOTTIR e cols., 1994; PEDERSEN e cols., 2004; SANTOS e cols., 2012). Em adipócitos de mulheres, a adição de estradiol ao ensaio, inibiu o efeito estimulador da adrenalina sobre a lipólise, e em amostras de tecido adiposo de mulheres com terapia de reposição estrogênica, a expressão dos receptores  $\alpha_{2A}$  está aumentada, explicando o aumento no tecido adiposo subcutâneo (PEDERSEN e cols., 2004). No tecido adiposo de tartarugas marinhas *Chelonia midas* fêmeas, tanto adrenalina como noradrenalina induzem aumento nos níveis de glicerol, porém essa resposta está diminuída durante o período reprodutivo (HAMMAN e cols., 2003). Em condições patológicas humanas, como a obesidade e a síndrome metabólica, a expressão dos receptores  $\alpha$  está aumentada e a dos receptores  $\beta$  está diminuída resultando em diminuição da lipólise (REYNISDOTTIR e cols., 1994). A diminuição do efeito lipolítico da noradrenalina também foi observada em adipócitos do tecido adiposo retroperitoneal de ratos tratados com dieta LPHC, associada a um aumento no *turnover* dessa catecolamina, sugestivo de uma condição de resistência a catecolaminas (SANTOS e cols., 2012). No presente trabalho, a adrenalina não apresentou efeito lipolítico significativo em relação à secreção basal de glicerol para o meio de incubação do hepatopâncreas. Estudos com antagonistas adrenérgicos de mamíferos sugerem a existência de receptores  $\alpha$  e  $\beta$  em crustáceos (CHANG e cols., 2011; 2012; HSIEH e cols., 2006). Como os estudos *in vivo* sugerem a existência de receptores adrenérgicos em *N. granulata*, é possível a presença de ambos os tipos de receptores e que a ativação simultânea de ambos tenha mantido o equilíbrio na lipólise, explicando a ausência

tanto de efeito estimulatório como inibitório. Para testar essa hipótese, é necessária a incubação dos tecidos em meios contendo noradrenalina, agonistas e antagonistas específicos.

## 5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados dos experimentos *in vivo* sugerem a presença de receptores adrenérgicos no hepatopâncreas e no músculo mandibular, enquanto os experimentos *in vitro* sugerem que esses receptores também possam estar presentes nas brânquias anteriores e brânquias posteriores do caranguejo *N. granulata*. Os efeitos da adrenalina são influenciados pela composição da dieta. Estudos *in vitro*, com a utilização de antagonistas seletivos e de noradrenalina, assim como a clonagem e o sequenciamento da estrutura molecular dos receptores adrenérgicos são necessários para a melhor compreensão dos efeitos metabólicos da adrenalina em crustáceos.

## REFERÊNCIAS

- APARICIO-SIMÓN, B.; PIÑÓN, M.; RACOTTA, R.; RACOTTA, I.S. 2010. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. **Aquaculture** **298**, 308 – 314.
- BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A.. Sistemas de Neurotransmissores. In: BEAR, Mark F.; CONNORS, Barry W.; PARADISO, Michael A.. **Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. Cap. 6, p. 144.
- BENDER, D.A.; MAYES, P.A. 2007. Capítulo 19: Metabolismo do Glicogênio. In: Murray, Granner e Kodwell. **Bioquímica Ilustrada**. 27ª ed., Ed. Lange.
- BIANCHINI, A.; LAUER, M.M.; NERY, L.E.M.; COLARES, E.P.; MONSERRAT, J.M. E SANTOS, E.A. 2008 Review: Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. **Comp Biochem. Physiol.** *In press* Manuscript ms13268.
- CERESÉR, K.M. E VIANNA, M.R.M.R. 2004. Capítulo 2: Neurotransmissores. In: Kapzinski, F.; Quevedo, J. E Izquierdo, I. Organizadores. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª.ed., Ed. Artmed.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. E FERRIER, D.R. 2009. **Bioquímica Ilustrada**. 4ª.ed., Ed. Artmed
- CHENG, W.; CHIU, H.; YEH, S. 2006. Norepinephrine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** **254**, 693 – 700.

CRYER, P. E. Diseases of the Sympathochromaffin System. In: FELIG, P.; BAXTER, J. D.; FROHMAN, A. L. **Endocrinology and Metabolism**. 3. ed. Omaha: Mc-graw-hill, 1985.

ELOFFSON, R., LAZMYR, L., ROSENGREN, E., HANSSON, C., 1982. Identification and quantitative measurements of biogenic amines and dopa in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). **Comp. Biochem. Physiol.** **71C**, 195–201.

FANJUL- MOLES, M.L. 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** **142**: 390-400.

FINGERMAN, M. AND NAGABHUSHAN, R. (1992). Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102C (3)**: 343-352.

FINGERMAN, M.; NAGABHUSHAN, R.; SAROJINI, R.; REDDY, P. S. (1994). Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. **J. Crustacean Biol.** **14**:413-437.

FRANÇA, Suélem Aparecida de et al. Low protein diet changes the energetic balance and sympathetic activity in brown adipose tissue of growing rats. **Nutrition**, [s.l.], v. 25, n. 11-12, p.1186-1192, nov. 2009. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.nut.2009.03.011. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S089990070900183X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

FRAYSSE, Benoit; GARRIC, Jeanne. Prediction and experimental validation of acute toxicity of  $\beta$ -blockers in *ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology And Chemistry*, [s.l.], v. 24, n. 10, p.2470-2476, 2005. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1897/04-541r.1.

GEARY,N.; LANGHANS, W.; SCHARRER, E. (1981). Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.* **241 (10)**: R330-335.

HAMANN, Mark; LIMPUS, Colin J.; WHITTIER, Joan M.. Seasonal variation in plasma catecholamines and adipose tissue lipolysis in adult female green sea turtles (*Chelonia mydas*). *General And Comparative Endocrinology*, [s.l.], v. 130, n. 3, p.308-316, fev. 2003. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0016-6480(02)00624-x.

HOFFMAN, B. Ativadores do adrenergicos e outros fármacos simpaticomiméticos. In: KATZUNG, D G. *Farmacologia Básica e Clínica*. 10. ed. São Paulo: Mcgraw-hill, 2008. Cap. 9.

HSIEH, S.L.; CHEN, S.M.; YANG, Y.H.; KUO, C.M. 2006. Involvement of norepinephrine in the hyperglycemic responses of the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, under cold shock. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143A**, 254 – 263.

INOHARA, Elen Thegla Sander et al. Serotonin effects in the crab *Neohelice granulata*: Possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues. *Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, [s.l.], v. 185, p.80-90, jul. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.03.012.

KOEPPEN, B.M. E STANTON, B.A. *Berne & Levy Fisiologia*. 6<sup>a</sup>.ed., Ed. Elsevier, 2009.



KUCHARSKI, L.C.R. (1990). Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata*. **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

KUCHARSKI, L. C. R.; DA SILVA, R. S. M.; (1991) Seasonal Variation in the Energy Metabolism in an Estuarine Crab, *Chasmagnathus granulata* (DANA, 1851). **Camp. Biochem. Physiol.** Vol 100 (3): 599-602.

KUO, C.M., HSU, C.R., LIN, C.Y., 1995. Hyperglycaemic effects of dopamine in tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture** **135**, 161–172.

KUO, C.M., YANG, Y.H., 1999. Hyperglycaemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Comp. Physiol.** **169B**, 49–54.

LEE, C.Y., YANG, P.S., ZOU, H.S., 2001. Serotonergic regulation of crustacean hyperglycemic hormone secretion in the crayfish, *Procambarus clarkii*. **Physiol. Biochem. Zool.** **74 (3)**, 376–382.

LORENZON, S.; BREZOVEC, S.; FERRERO, E.A.. Specie-specific effects on hemolymph glucose control by serotonin, dopamine, and L-enkephalin and their inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (Crustacea). **J. Exp. Zool.**, v. 301A, p.727 – 736, 2005.

LÜSCHEN, W; WILLIG, A; JAROS, PETER P. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas*. **Comp. Biochem. Physiol.** **Vol. 105C**, Nº 2, pp. 291-296.

MARQUEZE, Alessandra. **Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Neohelice granulata* mantidos com dieta rica em carboidratos ou proteínas.** 2004. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Ufrgs, Porto Alegre.

MELO, G.A.S. 1999. Infraordem BRACHYURA (Siris e Caranguejos: Espécies Marinhas e Estuarinas) In: Buckup, L. E Bond-Buckup, G. **Os Crustáceos do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, p.415-485.

MORENO, F. N.; BRITO, M. do N.. Regulação Hormonal da Gliceroneogênese. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 5, n. 1, p.161-173, abr. 2012.

O'CONNOR, J. D.; GILBERT, L. I. Aspects of lipid metabolism in crustaceans. **American Zoologist**, New Hampshire, v. 8, n. 3, p.529-568, ago. 1968.

OLLIVAUX, C.; SOYEZ, D.. Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 267, n. 16, p.5106-5114, ago. 2000. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01574.x.

OLLIVAUX, C. et al. Crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in the lobster *Homarus gammarus*. Implications for structural and functional evolution of a neuropeptide family. **Febs Journal**, [s.l.], v. 273, n. 10, p.2151-2160, maio 2006. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05228.x.

PEDERSEN, S. B.; KRISTENSEN, K.; HERMANN, P.A.; Katzenellenbogen, J.A.; Richelsen, B. (2004). Estrogen Controls Lipolysis by Up-Regulating  $\alpha$ 2A Adrenergic Receptors Directly in Human Adipose Tissue through the Estrogen Receptor  $\alpha$  Implications

for the Female Fat Distribution. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, **89** (4): 1869 – 1878.

PELLEGRINO, Ricardo. **Efeito do jejum e da realimentação sobre o metabolismo de aminoácidos no músculo e no hepatopâncreas do caranguejo *Neohelice granulata* submetido previamente à dieta rica em proteínas ou carboidratos**. 2011. 122 f. Tese (Doutorado) - Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Ufrgs, Porto Alegre, 2011.

PELLEGRINO, Ricardo et al. Effect of starvation and refeeding on amino acid metabolism in muscle of crab *Neohelice granulata* previously fed protein- or carbohydrate-rich diets. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 164, n. 1, p.29-35, jan. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.08.004.

PELLON-MAISON, M. et al. *Macrobrachium borellii* Hepatopancreas Contains a Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase Which Initiates Triacylglycerol Biosynthesis. **Lipids**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.337-344, 8 jan. 2009. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s11745-008-3275-1.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. 2008 Capítulo 12: Outros mediadores periféricos: 5-hidroxitriptamina e purinas. In: **Farmacologia**. 6a.ed., Ed. Elsevier.

REYNISDOTTIR, S.; ELLERFELDT, K.; WAHRENBERG, H.; LITHELL, H.; ARNER, P. (1993). Multiple Lipolysis Defects in the Insulin Resistance (Metabolic) Syndrome. **Journal Clinical Investigation**, Vol. **93**, pp 2590-2599

SAINATH, S.B.; REDDY, P.S. 2010. Melatonergic regulation of hemolymph sugar levels in the freshwater edible crab, *Oziotelphusa senex senex*. **J. Exp. Zool.** **313A**: 201 – 208.

SANTOS, E. A.; NERY, L. E.; MANZONI, G.C. 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.** **89 A (3)**: 329-332.

SANTOS, E.A.; KELLER, R.; RODRÍGUEZ, E.; LOPES, L. (2001). Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; **34(1)**: 75-80.

SANTOS, Maísa P. dos et al. A Low-Protein, High-Carbohydrate Diet Increases Fatty Acid Uptake and Reduces Norepinephrine-Induced Lipolysis in Rat Retroperitoneal White Adipose Tissue. **Lipids**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.279-289, 8 jan. 2012. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s11745-011-3648-8.

SATHYANANDAM, S.; VASUDEVAN, S.; NATESAN, M. (2008). Serotonin modulation of hemolymph glucose and crustacean hyperglycemic hormone titers in *Fenneropenaeus indicus*. **Aquaculture** **281**: 106-112.

SPIVAK, Eduardo D.. The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. **Helgoland Marine Research**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.149-154, 4 abr. 2010. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10152-010-0198-z.

VAN HANDEL, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt. Biochem.**, **11**:256-265.

VINAGRE AS, DA SILVA RSM. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp Biochem Physiol A** 1992.102:579-583.

VINAGRE, A S. (1999). **Metabolismo de Carboidratos no Caranguejo *Chasmagnathus granulata*: Efeito do Jejum e da Realimentação e da Apedunculacão Sobre a Adaptação ao Estresse Osmótico**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

WEBSTER, Simon George; KELLER, Rainer; DIRCKSEN, Heinrich. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. **General And Comparative Endocrinology**, [s.l.], v. 175, n. 2, p.217-233, jan. 2012. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.ygcen.2011.11.035.

WESTFALL, T.C.; WESTFALL, D.P. ANO. Capítulo 10: Agonistas e Antagonistas Adrenérgicos. In: Goodman & Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11<sup>a</sup>. Ed., editora

WÜRDIG, N. L. (1984). Ostracodes do sistema lagunar de Tramandaí, RS, Brasil, sistemática, ecologia e subsídios à paleoecologia. **Tese (Doutorado em paleontologia) – Curso de Pós-Graduação em Geociências**, Universidade Federal do rio Grande do Sul.

ZANOTELLI, R.; RAMIREZ, G.G.; RODRIGUES, C.R.R.; DA SILVA, R.S.M. E VINAGRE, A.S. 2002. Efeito de Monoaminas Sobre o Metabolismo de Carboidratos no Caranguejo *Chasmagnathus granulata*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA, No. 1**, pp 57 a 66.

