

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

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS  
NO CARANGUEJO *Neohelice granulata***

Dissertação de Mestrado

ELEN THEGLA SANDER INOHARA

Porto Alegre, 2013



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



**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS NO  
CARANGUEJO *Neohelice granulata***

ELEN THEGLA SANDER INOHARA

Orientadora: Dra. Anapaula Sommer Vinagre

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, 2013

## **Comissão Examinadora**

Wania Aparecida Partata  
Prof<sup>ª</sup> Doutora do Programa de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS

Patrícia Pereira  
Prof<sup>ª</sup> Doutora do Programa de Pós-graduação em  
Neurociências – UFRGS

Marta Marques de Souza  
Prof<sup>ª</sup> Doutora do Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Rio Grande - FURG

Dedico este trabalho ao meu amor, Mauricio, meu  
porto seguro...

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Anapaula Sommer Vinagre, que possibilitou a concretização deste trabalho, compartilhando seu imenso conhecimento, me amparando nas horas difíceis e contribuindo para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família abençoada, especialmente meu esposo, Mauricio, e minha mãe, Thegla, que sempre acreditaram nos meus projetos e me apoiaram nos momentos difíceis.

À professora Márcia Trapp, pelos ensinamentos e ajuda nos experimentos e às professoras Elenir de Fátima Willand, Wania Aparecida Partata e Denise Maria Zancan, pela ajuda nos experimentos e preparação das lâminas histológicas.

Ao professor Luciano de Fraga Stürmer por compartilhar seu conhecimento, ajuda imprescindível na técnica de imunoistoquímica e auxílio na correção da dissertação.

Aos professores Luiz Carlos R. Kucharski e Roselis Silveira Martins da Silva por partilhar seus conhecimentos.

À minha querida colega de curso, Raquel D'Agostini Silva, pelas inúmeras horas que compartilhamos nos estudos, pelos ensinamentos, pela grande amizade, ajuda nos experimentos, por me apoiar nos momentos difíceis e compartilhar as vitórias.

À colega de curso Camila Lüdke Rossetti, e de laboratório, Aline da Silva Gonçalves, Ana Lúcia Hoefel e Cláudia Vieira Marques, pela amizade, momentos de alegria, ajuda nos experimentos e ensinamentos.

Aos estudantes de iniciação científica do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), em especial ao Charles B. Pinto, Jorge Felipe

A. Model e Lucas S. Rilho, “meus filhotes”, pela ajuda nos experimentos e momentos de descontração.

Ao colega de laboratório Tiago Leal Martins, pela ajuda nos experimentos, por compartilhar seu conhecimento e pelas divertidas coletas de animais.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia, por me guiarem na busca do conhecimento e contribuírem na minha formação docente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo e a Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PROPG), pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

A serotonina está presente no Sistema Nervoso Central (SNC), gânglios periféricos, e órgãos neuroendócrinos de crustáceos, participando de muitos processos fisiológicos. Receptores serotoninérgicos com perfil farmacológico similar ao dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> de vertebrados já foram identificados em crustáceos, assim como os efeitos de vários agonistas e antagonistas destes receptores.

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a localização dos receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo *Neohelice granulata* pela técnica de *binding*, utilizando serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>), identificar o perfil fisiológico e farmacológico dos receptores pela técnica de *binding*, utilizando metiotepina, antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub> e ciproeptadina, antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> e verificar o efeito dos antagonistas sobre o metabolismo de carboidratos e a postura de caranguejos *N. granulata*. Os experimentos *in vivo* e *in vitro*, foram realizados com grupos de animais alimentados com dieta rica em proteínas (RP), rica em carboidratos (RC) e animais do campo.

O presente trabalho mostra que fatores nutricionais relacionados às dietas oferecidas aos caranguejos interagem com a serotonina, controlando a homeostase da glicose. Resultados obtidos com a administração dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sugerem que os receptores serotoninérgicos envolvidos no controle do metabolismo de carboidratos possam ter um mecanismo de ação similar aos receptores 5-HT<sub>2</sub> de mamíferos.

A administração de serotonina e ciproeptadina nos animais promoveu uma forte flexão de membros e abdome. No entanto, a administração de metiotepina promo-

veu um relaxamento da musculatura, sugerindo a existência de receptores com perfil farmacológico similar aos receptores 5-HT<sub>1</sub> de mamíferos no sistema nervoso periférico.

Não foram encontradas terminações nervosas próximas ou se inserindo nas lamelas branquiais, e também não se observou qualquer neurônio imunorreativo à serotonina em ambas as brânquias, sugerindo que a serotonina seja liberada de órgãos neuroendócrinos para a hemolinfa do *N. granulata*, e tenha sua ação como neuro-hormônio nas brânquias.

Foram localizados receptores serotoninérgicos no caranguejo *N. granulata* através da ligação específica de serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>) nas brânquias posteriores, maior ligação entre todos, brânquias anteriores, coração, hepatopâncreas e músculo mandibular.

Experimentos *in vivo* mostraram no músculo, hepatopâncreas e coração, que a administração de 5-HT juntamente com 5-HT-H<sup>3</sup> promove redução da ligação em seus receptores em animais do campo, demonstrando a especificidade da ligação. Nos animais em dieta RC ou RP a ligação não foi alterada, sugerindo um possível efeito da dieta sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. Resultados da administração dos antagonistas no músculo, em conjunto com os obtidos na reação postural, reforçam a hipótese da presença de receptores com perfil farmacológico similar aos 5HT<sub>1</sub> de mamíferos neste tecido. No hepatopâncreas e coração, a administração dos antagonistas sugerem a presença de receptores com perfil farmacológico distinto dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>. Em ambas as brânquias, observou-se que a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> é alterada em função do tempo de injeção e apresentam alta ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. Nos animais da dieta RP a administração de 5-HT reduziu a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em ambas as brânquias, confirmando a especificidade da ligação e a dopamina reduziu a ligação de



5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores. Com a administração dos antagonistas, sugere-se a existência de receptores serotoninérgicos nas brânquias com perfil farmacológico similar aos receptores 5-HT<sub>1</sub> de mamíferos. Nos animais alimentados com dieta RC e do campo, não foram observadas alterações na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> com o uso de 5-HT, dopamina e antagonistas em ambas as brânquias, mostrando novamente que a dieta pode estar interferindo na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>.

Em estudos *in vitro* realizados em ambas as brânquias, as curvas de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> e serotonina em caranguejos alimentados com ambas as dietas, mostram que a serotonina inibe a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de forma dose-dependente, demonstrando a especificidade da ligação. A metiotepina e ciproeptadina não inibiram a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de forma dose-dependente, mas observa-se uma diminuição de aproximadamente 50% na ligação em ambas as brânquias de animais alimentados com dieta RP, evidenciando a existência de receptores do tipo 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub> nestes tecidos.

O presente trabalho propõe a existência de receptores serotoninérgicos nas brânquias posteriores e anteriores, coração, hepatopâncreas e músculo mandibular do caranguejo *N. granulata* e que a dieta oferecida aos animais interfere na ligação da serotonina em seus receptores nestes tecidos-alvo periféricos. Existem provavelmente três tipos de receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo *N. granulata*: um receptor 5-HT<sub>1Neo</sub> com perfil similar ao receptor 5-HT<sub>1</sub> de mamífero; um receptor 5-HT<sub>2Neo</sub> com perfil similar ao receptor 5-HT<sub>2</sub> e provavelmente, um terceiro, o 5-HT-H<sub>3Neo</sub> com perfil farmacológico indeterminado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Serotonina, metiotepina, ciproeptadina, receptores serotoninérgicos, crustáceos, *Neohelice granulata*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**H.E.** - Hematoxilina e Eosina

**PAS** - Ácido Periódico de Schiff

**RC** - Rica em carboidratos

**RP** - Rica em proteínas

**SFC** - Solução fisiológica para crustáceos

**SFCT** - Solução fisiológica para crustáceos com serotonina triciada

**5-HT** – Serotonina

**5-HT-H<sup>3</sup>** – Serotonina triciada

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Síntese de serotonina a partir do triptofano.....02
- Figura 2** – Postura do lagostim *Parastacus defossus* 30 minutos após a administração de solução fisiológica para crustáceos (A) ou serotonina (B).....14
- Figura 3** – Concentração de glicose na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata*, intactos (controle) e apedunculados, alimentados com dieta RP (A) e RC (B), 60 e 120 minutos após a administração de salina, serotonina ou dopamina.....17
- Figura 4** – Mecanismo de transporte para a absorção de NaCl transbranquial através das brânquias de caranguejos hiperosmorregulatórios.....20
- Figura 5** – Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a glicemia, em caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), no tempo zero e após 60 ou 120 minutos.....41
- Figura 6** – Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio em brânquias anteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos.....42
- Figura 7** – Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio em brânquias posteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos.....43
- Figura 8** – Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio no músculo mandibular de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos.....44

<b>Figura 9</b> – Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos.....	45
<b>Figura 10</b> – Efeitos da injeção de serotonina e do antagonista metiotepina sobre a postura no caranguejo <i>N. granulata</i> .....	46
<b>Figura 11</b> – Ligação de serotonina triciada (5-HT-H <sup>3</sup> ) nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), hepatopâncreas (HP), brânquias anteriores (BA) e brânquias posteriores (BP), de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B) nos tempos de 15, 30 e 60 minutos.....	48
<b>Figura 12</b> – Ligação específica de 5-HT-H <sup>3</sup> nos grupos SFCT, serotonina e dopamina nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), brânquias posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e hepatopâncreas (HP) de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B).....	50
<b>Figura 13</b> – Efeitos do uso de antagonistas sobre a ligação de 5-HT-H <sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), hepatopâncreas (HP), brânquias anteriores (BA) e brânquias posteriores (BP), de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), com os grupos SFCT, metiotepina e ciproeptadina.....	52
<b>Figura 14</b> – Ligação de serotonina triciada (5-HT-H <sup>3</sup> ) nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), brânquias posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e hepatopâncreas (HP), de caranguejos sem aclimação e dieta, nos grupos SFCT e serotonina.....	53
<b>Figura 15</b> – Curva de tempo de ligação de 5-HT-H <sup>3</sup> 782, serotonina, metiotepina e ciproeptadina em brânquias anteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) e rica em carboidratos (B) nos tempos de 5, 15 e 30 minutos. Grupos SFCT, serotonina, metiotepina e ciproeptadina.....	55

**Figura 16** – Curva de tempo de ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>, serotonina, metiotepina e ciproptadina nas brânquias posteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) e rica em carboidratos (B) nos tempos de 5, 15 e 30 minutos. Grupos SFCT, serotonina, metiotepina, e ciproptadina.....57

**Figura 17** – Curva de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> (SFCT) e serotonina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC). Grupos: SFCT, doses de serotonina: 10<sup>-12</sup>M, 10<sup>-11</sup>M, 10<sup>-10</sup>M, 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M e 10<sup>-6</sup>M.....58

**Figura 18** – Curva de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> (SFCT) e serotonina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC). Grupos: SFCT, doses de serotonina: 10<sup>-12</sup>M, 10<sup>-11</sup>M, 10<sup>-10</sup>M, 10<sup>-9</sup>M, 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-7</sup>M e 10<sup>-6</sup>M.....59

**Figura 19** – Curva de competição de metiotepina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). SFCT, Metiotepina 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-4</sup>M.....60

**Figura 20** – Curva de competição de metiotepina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). SFCT, Metiotepina 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M e 10<sup>-4</sup>M.....61

**Figura 21** – Curvas de competição de ciproptadina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). SFCT, Ciproptadina 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M e 10<sup>-4</sup>M.....62

**Figura 22** – Curvas de competição de ciproptadina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). SFCT, Ciproptadina 10<sup>-7</sup>M, 10<sup>-6</sup>M, 10<sup>-5</sup>M e 10<sup>-4</sup>M.....62

<b>Figura 23</b> – Curvas de competição de serotonina, metiotepina e ciproeptadina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B).....	63
<b>Figura 24</b> – Curvas de competição de serotonina, metiotepina e ciproeptadina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B).....	64
<b>Figura 25</b> – Fotomicrografias de cortes histológicos do hepatopâncreas em coloração H.E. ....	66
<b>Figura 26</b> – Fotomicrografias de cortes histológicos do hepatopâncreas em coloração PAS.....	67
<b>Figura 27</b> – Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo mandibular em coloração H.E. (A e B) e PAS (C).....	68
<b>Figura 28</b> – Fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias anteriores do caranguejo <i>N. granulata</i> em coloração H.E. ....	69
<b>Figura 29</b> – Fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias posteriores em coloração H.E. ....	70
<b>Figura 30</b> – Fotomicrografia de corte histológico da brânquia anterior do caranguejo <i>N. granulata</i> , em coloração azul de metileno.....	71
<b>Figura 31</b> – Fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias anteriores em coloração H.E. (A) e após o procedimento de imunistoquímica para a serotonina (B). Fotomicrografia de corte histológico de medula espinal de rato submetido ao procedimento de imunistoquímica para a serotonina (C).....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Classificação dos receptores de serotonina em mamíferos.....	04
<b>Tabela 2</b> – Tipos de receptores serotoninérgicos nos moluscos <i>Lymnaea stagnalis</i> e <i>Aplysia californica</i> .....	10
<b>Tabela 3</b> – Tipos de receptores dos nematóides <i>Caenorhabditis elegans</i> e <i>Ascaris suum</i> .....	11
<b>Tabela 4</b> – Tipos de receptores serotoninérgicos de <i>Drosophila melanogaster</i> .....	12
<b>Tabela 5</b> – Tipos de receptores dos crustáceos <i>Panulirus interruptus</i> e <i>Procambarus clarkii</i> .....	13

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>3.1. Coleta e manutenção dos animais</b> .....	23
<b>3.2. Procedimentos experimentais</b> .....	23
<b>3.3. Estudos “<i>in vivo</i>”</b>	
3.3.1. Efeitos da injeção de serotonina e dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre o metabolismo de carboidratos e a postura.....	24
3.3.2. Curva de tempo para ligação de 5-HT-H <sup>3</sup> em tecidos-alvo periféricos.....	26
3.3.3. Ligação específica de 5-HT-H <sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos.....	27
3.3.4. Efeito dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre a ligação de 5-HT-H <sup>3</sup> .....	28
3.3.5. Ligação específica de 5-HT-H <sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo sem aclimatação e dieta.....	28
<b>3.4. Estudos “<i>in vitro</i>”</b>	
3.4.1. Curva de tempo para serotonina e antagonistas nas brânquias anteriores e posteriores.....	29
3.4.2. Curva de dose de serotonina nas brânquias anteriores e posteriores.....	31
3.4.3. Curvas de dose de metiotepina e de ciproeptadina nas brânquias anteriores e posteriores.....	32
<b>3.5 Análises bioquímicas</b>	
3.5.1. Determinação da glicemia.....	33



3.5.2. Determinação do glicogênio.....	33
3.5.3. Determinação da radioatividade das amostras.....	33
<b>3.6 Análises histológicas</b>	
3.6.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E.).....	34
3.6.2. Coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS).....	35
3.6.3. Observação do sistema nervoso com coloração azul de metileno.....	35
3.6.4. Imunoistoquímica.....	37
<b>3.7. Análise estatística.....</b>	<b>39</b>

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudos “*in vivo*”

4.1.1. Efeitos da injeção de serotonina e dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre o metabolismo de carboidratos e a postura.....40

4.1.2 Curva de tempo para ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em tecidos alvo periféricos.....47

4.1.3. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos.....49

4.1.4. Efeito dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>.....51

4.1.5. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo sem aclimação e dieta.....52

### 4.2 Estudos “*in vitro*”

4.2.1. Curva de tempo para 5-HT fria e antagonistas nas brânquias anteriores e posteriores.....53

4.2.2. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores.....58

4.2.3 Efeito da metiotepina sobre a ligação 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores.....60

4.2.4 Efeito da ciproeptadina sobre a ligação 5-HT-H <sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores.....	61
4.2.5 Comparação entre os efeitos da serotonina e dos antagonistas sobre a ligação 5-HT-H <sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores.....	63
<b>5. Análises histológicas</b>	
5.1. Coloração com hematoxilina e eosina (H.E.) e ácido periódico de Schiff (PAS).....	65
5.3. Observação do sistema nervoso com coloração azul de metileno.....	70
5.4. Imunoistoquímica.....	71
<b>5. DISCUSSÃO</b>	
5.1 Estudos “ <i>in vivo</i> ” .....	73
5.1 Estudos “ <i>in vitro</i> ” .....	83
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	85
<b>7. PERSPECTIVAS</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

As monoaminas compreendem um grupo de moléculas muito importantes nos animais. Este grupo de moléculas pode ser subdividido em dois subgrupos: as catecolaminas, que contém um anel catecol, e as indoleaminas, caracterizadas pela presença de um anel indólico em sua estrutura química (Ceresér e Vianna, 2004; Kapczinski et al., 2004; Rang e cols., 2008). A indoleamina serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) (Figura 1), foi descoberta no final de 1940 e na década seguinte, havia indicações da sua existência no sistema nervoso central dos animais e da sua função como neurotransmissor (Peroutka, 1984). Além das terminações nervosas, a serotonina é encontrada em corpos de neurônios, em células enterocromafins do estômago e plaquetas (Pytliak et al., 2011).

Nos vertebrados, a serotonina é um dos neurotransmissores de maior distribuição pelo organismo, sendo sintetizada principalmente, nos núcleos da rafe, no tronco encefálico, leucócitos, e nas células cromafínicas do sistema nervoso entérico (Silva, 2002; Lam e Heisler, 2007). Apresenta uma gama variada de funções no Sistema Nervoso Central (SNC), controlando: o comportamento emocional, o ciclo sono – vigília, o apetite, a termorregulação, a pressão sanguínea, a percepção dolorosa e a liberação de sinalizadores neuroendócrinos (Silva, 2002). Segundo Watanabe et al. (2010), 98% da serotonina corporal é sintetizada e estocada no sistema nervoso periférico, podendo agir como neurotransmissor em terminações axonais e também como neuro-hormônio. Periféricamente, a serotonina promove vasoconstrição, a motilidade intestinal, hemostasia primária, reparo hepático e controla as células T do sistema imune (Watanabe et al., 2010). Segundo estes autores,

esses dois sistemas serotoninérgicos, central e periférico, sintetizam serotonina independentemente e apresentam funções distintas.

A função destes sistemas serotoninérgicos irá depender de três processos principais: 1) síntese e degradação da serotonina; 2) recaptação da serotonina da fenda sináptica por transportadores de serotonina (SERT) e 3) da densidade e da sensibilidade de seus receptores (Popova, 2008).

A síntese da serotonina ocorre em dois passos, como pode ser observado na Figura 1 (Kapczinski et al., 2004). Primeiramente, o triptofano, um aminoácido essencial, com disponibilização no organismo completamente dependente da dieta, é hidroxilado em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da enzima citosólica triptofano hidroxilase. Esta primeira etapa, limitante da síntese de 5-HT, foi encontrada no cérebro apenas nos neurônios serotoninérgicos. A seguir, o 5-HTP é descarboxilado por uma enzima sinaptossomal 5-HTP descarboxilase gerando a 5-hidroxitriptamina (serotonina) (Kapczinski et al., 2004; Silva, 2002; Pytliak et al., 2011).

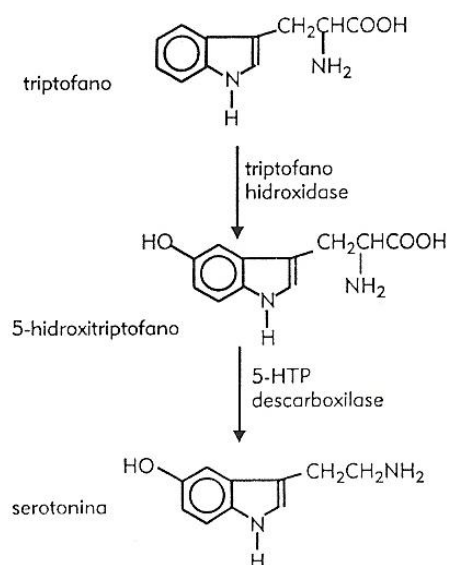


Figura 1- Síntese de serotonina a partir do triptofano. Adaptada de Kapczinski et al. (2004).

Em mamíferos foram descritas duas isoformas da enzima triptofano hidroxilase, TPH1 e TPH2. A TPH1 é encontrada na glândula pineal, timo, baço e células enterocromafins do trato gastrointestinal, enquanto a TPH2 é encontrada somente em neurônios, como os dos núcleos da rafe. Em camundongos sem TPH1, os níveis de serotonina na circulação e trato gastrintestinal são baixos ou inexistentes, enquanto mantém os níveis normais no cérebro, reforçando a independência entre o sistema serotoninérgico central e periférico (Watanabe et al., 2010).

A serotonina foi identificada em cnidários, indicando que ela é um dos mais antigos neurotransmissores na escala filogenética (Silva, 2002). A presença de serotonina em crustáceos foi confirmada com o uso de técnicas imunocitoquímicas, eletroforese e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Fingerman e Naga-bhushanam, 1992; Fingerman et al., 1994). Ela está presente no sistema nervoso central, incluindo o pedúnculo ocular, nos gânglios periféricos, como o gânglio es-tomatogástrico e também em órgãos neuroendócrinos, como o órgão pericárdico, em várias espécies de crustáceos (Fingerman et al., 1994; Fingerman, 1997).

No sistema nervoso dos crustáceos, a serotonina pode agir como neuro-transmissor, neuromodulador ou neuro-hormônio. Periféricamente age principal-mente como neuro-hormônio (Fingerman et al., 1994). Evidências sugerem que ela estimula a mudança de cor, a reprodução, a osmorregulação, a atividade cardíaca, a contração muscular, a atividade nervosa, a quimio e mecanorecepção, o compor-tamento e o metabolismo de carboidratos (Fingerman et al., 1994; Tiu et al., 2005; Meeratana et al., 2006; Sathyanandam et al., 2008).

Conforme já descrito, a serotonina possui muitos efeitos no sistema nervoso central e periférico de vertebrados. Esta variedade de efeitos está relacionada a

existência de muitos tipos de receptores serotoninérgicos nestes animais. Em mamíferos, 14 tipos de receptores 5-HT já foram identificados e subdivididos em 7 famílias (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT-H<sup>3</sup>, 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub>, 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>) (Silva, 2002; Ongvarasopone et al., 2006). Somente os receptores da família 5-HT-H<sup>3</sup> são do tipo ionotrópicos, nas demais famílias, os receptores são do tipo metabotrópicos associados a proteínas G (GPCRs) (Tierney, 2001; Silva, 2002; Ceresér e Vianna, 2004).

As subpopulações das famílias de receptores de 5-HT, o mecanismo de ação e seus principais agonistas e antagonistas estão resumidos na Tabela 1 (Silva, (2002); Ceresér e Vianna, (2004); Fuchs e cols., (2004); Brunton e cols., (2006); Katzung, (2006); Rang e cols., (2008)).

Tabela 1: Classificação dos receptores de serotonina em mamíferos.

<b>Família 5-HT</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Agonista</b>	<b>Antagonista</b>
5-HT <sub>1A</sub>	Inibição da adenilatociclase	8- OH-DPAT BUSPIRONA, GEPIRONA, IPSA-PIRONA e IPSAPERONA (agonista parcial) LSD	WAY 100635
5-HT <sub>1B</sub> (5-HT <sub>1D6</sub> )	Inibição da adenilatociclase	ZOLMITRIPTANA NARATRIPTANA RIZATRIPTANA SUMATRIPTANO FROVATRIPTANO CP931295	METIOTEPINA
5-HT <sub>1D</sub>	Inibição da adenilatociclase	SUMATRIPTANO ZOLMITRIPTANA NARATRIPTANA RIZATRIPTANA FROVATRIPTANO	-----
5-HT <sub>1E</sub>	Inibição da adenilatociclase	-----	-----
5-HT <sub>1F</sub> (5-HT <sub>1E6</sub> )	Inibição da adenilatociclase	-----	-----
5-HT <sub>1P</sub>	Inibição da adenilatociclase	5-HIDROXIINDALPINA	RENZAPRIDA
5-HT <sub>2A</sub> (receptor D)	Ativação da fosfolipase C	α-Metil 5-HT DOI LSD LSD25	RITANSERINA METILSERGIDA (não seletivo) CIPROEPTADINA CETANSERINA CLOZAPINA RISPERIDONA TRAZODONA
5-HT <sub>2B</sub>	Ativação da fosfolipase C	α-Metil 5-HT DOI	CIPROEPTADINA SB204741
5-HT <sub>2C</sub>	Ativação da fosfolipase C	α-Metil 5-HT DOI	METILSERGIDA (não seletivo) CIPROEPTADINA

		LSD LSD25	CETANSERINA CLOZAPINA RISPERIDONA MESULERGINA TRAZODONA MESULERGINA
5-HT-H <sup>3</sup> (receptor M)	Ionotrópicos É um canal p Na+K+ Receptor <i>Cysloopfamily</i>	2 ME (2 metil 5-HT) CLOROFENILBIGUANIDA	ONDANSETRONA TROPISETONA GRAMISETONA GRANISETRON DOLASSETRONA GRANISSETRONA
5-HT <sub>4</sub>	GPCR ↑AC - ↑AMPc Ativação da fosfolipase C	TEGASERODE (agonista parcial) RENZAPRIDA CISAPRIDA 5-METOXITRIPTAMINA METOCLOPRAIMIDA	GR 113808 SG 207266
5-HT <sub>5A</sub>	GPCR ↓ AMPc	5 CT	-----
5-HT <sub>5B</sub> só em ratos	Desconhecida	-----	-----
5-HT <sub>6</sub>	GPCR ↑AC - ↑AMPc	-----	-----
5-HT <sub>7</sub>	GPCR ↑AC - ↑AMPc	5 -CT LSD	OZOPINA CLOZAPINA

AC, adenililciclase; AMPc, adenosina monofosfato cíclico; GPCR, receptores acoplados a proteína G; 8-OH-DPAT- 8-hidróxi- (2,N,N-dipropilamino) -tetralina; DOI, 1- (2,5-dimetóxi-4-iodofenil) isopropilamina; LSD, dietilamida do ácido D-lisérgico; SB204741= N - (1-metil-5-indolil) - N' - (3-metil-5-isotiazolil) uréia; WAY 100635 = N- tert-Butil 3-4- (2-metoxifenil) piperazin-1-il-2-fenilpropanamida; CP931295 = 5-Hidroxi-3 (4-1,2,5,6-tetraidropiridil)-4-azaindol; 5-CT, 5-Carboxamidotryptamine.

Os subtipos dos receptores de 5-HT foram descobertos em 1957 quando Gaddum e Picarelli investigaram duas ações fisiológicas da serotonina que foram bloqueadas por diferentes antagonistas. A evidência da existência de mais de um tipo de receptor foi confirmada posteriormente com a técnica de *binding* usando traçadores radioativos (Tierney, 2001; Silva, 2002). Peroutka e Snyder (1979) estabeleceram a existência de dois distintos receptores, o 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>. O primeiro clone do receptor de 5-HT (5-HT<sub>1A</sub>) foi descrito por Kobilka et al., em 1987 (Tierney, 2001; Silva, 2002).

Os receptores da família 5-HT<sub>1</sub> consistem em cinco subtipos de receptores (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> e 5-HT<sub>1F</sub>), com homologia estrutural humana de

40-63% (Pytliak et al., 2011). Em mamíferos, receptores de serotonina da família 5-HT<sub>1</sub> acoplados a proteína Gi, iniciam sua cascata de sinalização através da inibição da adenililciclase (AC) e consequente diminuição dos níveis de AMPc intra-celular. Com a diminuição dos níveis de AMPc a proteína cinase A (PKA), dependente de AMPc, não é ativada (Aires e cols., 2008; Pytliak et al., 2011).

O receptor 5-HT<sub>1A</sub> têm a maior distribuição de todos os receptores de 5-HT, presente no córtex cerebral, hipocampo, *septum*, amígdala, núcleo da rafe e pequena quantidade nos núcleos da base e tálamo. Também está presente em todo trato gastrintestinal e plexo mioentérico. No cérebro, os receptores 5-HT<sub>1A</sub> agem como autoreceptores e receptores pós-sinápticos, e estão envolvidos na inibição da descarga dos neurônios, na regulação da produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), regulação do comportamento, fome e ansiedade (Pytliak et al., 2011).

Os receptores 5-HT<sub>1B</sub> estão presentes no SNC, onde induzem a inibição pré-sináptica e efeitos comportamentais. Estão presentes em muitas partes do cérebro, e a maior concentração encontra-se nos núcleos da base, estriado, onde agem como autoreceptores, inibem a liberação de serotonina e no córtex frontal, inibem a liberação de dopamina em terminais receptores. No sistema vascular, promovem a vasoconstrição pulmonar (Pytliak et al., 2011).

Os receptores 5-HT<sub>1D</sub> agem como autoreceptores no núcleo dorsal da rafe, mas também foram encontrados no coração onde modulam a liberação de serotonina. No SNC, estão envolvidos na locomoção e ansiedade. Eles também induzem a vasoconstrição cerebral (Pytliak et al., 2011).



A função dos receptores 5-HT<sub>1E</sub> ainda é desconhecida, mas sugere-se que estão envolvidos na regulação da memória, devido a abundância de receptores encontrada no córtex frontal, hipocampo e bulbo olfatório (Pytliak et al., 2011).

Receptores 5-HT<sub>1F</sub> foram encontrados no útero e artéria coronária, sugerindo um possível papel na constrição vascular. Embora a distribuição no cérebro pareça limitada, há semelhanças de distribuição com os receptores 5-HT<sub>1Dβ</sub> (Pytliak et al., 2011).

A classe dos receptores 5-HT<sub>2</sub> é composta por três subtipos: 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, mostrando homologia estrutural de 46-50% (Pytliak et al., 2011). Tradicionalmente, receptores de mamíferos do tipo 5-HT<sub>2</sub> estão acoplados a proteína Gq que ativa a enzima fosfolipase C (PLC). A PLC ativada, hidroliza a fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>), produzindo desta forma inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> age nas reservas de cálcio intra-celular, liberando e aumentando o Ca<sup>2+</sup> intra-celular e juntos, Ca<sup>2+</sup> e DAG ligam-se nos sítios C2 e C1 da proteína cinase C (PKC), respectivamente, ligando assim a PKC na membrana plasmática onde é ativada pela associação com fosfatidil serina (Clark et al., 2004).

A PKC está envolvida no controle de funções de outras proteínas através da fosforilação de grupos hidroxila de serina e treonina em resíduos de aminoácidos destas proteínas. A PKC é ativada por sinais (como aumento na concentração de DAG ou íons Ca<sup>2+</sup>), e desempenha papéis importantes na cascata de transdução de diversos sinais. A família PKC é dividida em três subfamílias, baseada na necessidade do segundo mensageiro: clássica, nova e atípica. A clássica, com as isoformas α, βI, βII, e γ, requer Ca<sup>2+</sup>, DAG e fosfolípido para ativação, a nova, com as isoformas δ, ε, η, e θ, requer DAG, mas não requer Ca<sup>2+</sup> para ativação. Estas duas subfamílias são ativadas através da mesma via de transdução de sinal, a fos-

folipase C. A isoforma atípica, que inclui as isoformas de proteínas cinases M $\zeta$  e  $\iota$  /  $\lambda$ , não requer nem DAG ou íons Ca<sup>2+</sup> para ativação (Mellor et al., 1998).

O subtipo 5-HT<sub>2A</sub> é expresso em muitos tecidos centrais e periféricos, e media a resposta da contração de músculo liso, aumentam a agregação plaquetária e aumentam a permeabilidade capilar. No SNC, os receptores 5-HT<sub>2A</sub> estão presentes principalmente nos núcleos da base, *crust* e *claustrum*. Quando ativados, os receptores levam a estimulação de secreção de ACTH, corticosterona, ocitocina, renina e prolactina. A inibição do receptor influencia o comportamento (Pytliak et al., 2011).

A ativação do receptor 5-HT<sub>2B</sub> promove a contração do músculo liso do fundo do estômago. No SNC foi detectado no cerebelo, hipotálamo, septo lateral e parte medial da amígdala. Devido à falta de ligantes seletivos para o subtipo 5-HT<sub>2C</sub>, suas ações permanecem pouco conhecidas (Pytliak et al., 2011).

Em miócitos isolados, foi verificado que a serotonina e agonistas de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> aumentam a captação de glicose por aumento no recrutamento de transportadores de glicose na membrana plasmática (Lam e Heisler, 2007).

O bloqueio dos receptores, com o uso de antagonistas da serotonina, constitui a principal abordagem farmacológica para a limitação dos efeitos da serotonina (Katzung, 2006).

A metiotepina,  $\{(1-[10,11\text{-dihidro-8-(metiltio)b,f\ tepina-10-41] 4\text{-metilpiperazina maleato})\}$ , é um antagonista de receptores 5-HT<sub>1</sub> agindo em receptores pré e pós sinápticos em ratos e coelhos. Nestes animais, a metiotepina causa aumento compensatório na síntese de serotonina por causar elevações nos níveis de triptofânio e 5-hidroindoleaminas no sistema nervoso central (Jacoby et al., 1975).

A ciproeptadina, 4-(5H- dibenzo [a,d] ciclohepteno -5- ilideno) -1 - metilpipe-ridina hidrocloreada ou *periactin*<sup>TM</sup>, é considerada um antagonista 5-HT<sub>2</sub> clássico bloqueando os receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> em mamíferos (Frassetto et al., 2006; Mercer et al., 1991). Também exerce ações sobre receptores histamínicos (H1) e muscarínicos (M), sendo farmacologicamente utilizada como agente anti-histamínico e orexígeno (Katzung, 2006). Elevações nos níveis de glicogênio no diafragma e da atividade locomotora foram verificados em ratos tratados com sibutramina, inibidor da recaptação de serotonina e dopamina. Este efeito foi revertido pela administração de ciproeptadina (Frassetto et al., 2006).

Estudos filogenéticos sugerem que, assim como outras famílias de proteínas, os receptores serotoninérgicos emergiram a partir da duplicação de genes seguida por mutações, há cerca de 700 milhões de anos. Estes eventos antecederam o surgimento dos vertebrados, que teria ocorrido há aproximadamente 650 milhões de anos (Tierney, 2001).

Em invertebrados, foram identificados receptores serotoninérgicos em insetos, moluscos, nematóides e crustáceos (Tierney, 2001; Clark et al., 2004; Tiu et al., 2005; Ongvarrasopone et al., 2006; Spitzer et al., 2008). Os receptores serotoninérgicos de invertebrados são homólogos aos de vertebrados, porém, devido ao longo tempo, novas mutações e alterações gênicas podem ter ocorrido originando novos tipos de receptores independentemente em invertebrados e vertebrados (Tierney, 2001).

O molusco marinho *Aplysia californica* tem sido utilizado como espécie modelo para o estudo dos mecanismos celulares e moleculares do aprendizado e da memória, nos quais a serotonina desempenha um papel fundamental. O tratamento dos neurônios sensoriais de *Aplysia* com ciproeptadina revelou que a ciproeptadina

bloqueia a facilitação sináptica induzida por serotonina, mas não bloqueia a sensibilidade somática induzida por serotonina, sugerindo a existência de mais de um tipo de receptores 5-HT em seus neurônios sensoriais (Mercer et al., 1991).

Posteriormente foram clonados 5 genes dos receptores de 5-HT em moluscos, dois em *Lymnaea stagnalis* e três em *Aplysia californica* (Tabela 2) (Tierney, 2001).

Tabela 2 – Tipos de receptores serotoninérgicos nos moluscos *Lymnaea stagnalis* e *Aplysia californica*. Adaptado de Tierney (2001).

Molusco/ Receptor	Homologia a mamíferos	Mecanismo de Ação
<i>Lymnaea stagnalis</i> 5-HT <sub>lym</sub>	53% - 5-HT <sub>1A</sub> 36% - 5-HT <sub>2</sub>	acoplado à proteína G <sub>i</sub> inibe a adenilato ciclase
<i>Lymnaea stagnalis</i> 5-HT <sub>2Lym</sub>	similar ao 5-HT <sub>2</sub>	Ativa a Fosfolipase C ↑ IP
<i>Aplysia californica</i> Ap5-HT <sub>B1</sub>	31% - 5-HT <sub>6</sub> 27% - 5-HT <sub>1B</sub> 23% - 5-HT <sub>2A</sub>	Expresso no sistema reprodutivo Ativa a Fosfolipase C ↑ IP
<i>Aplysia californica</i> Ap5-HT <sub>B2</sub>	-----	Expresso no sistema nervoso Ativa a Fosfolipase C ↑ IP
<i>Aplysia californica</i> 5-HT <sub>ap1</sub>	52% - 5-HT <sub>1</sub> 47% - 5-HT <sub>1B</sub> 41% - 5-HT <sub>7</sub>	proteína G <sub>i</sub> inibe a adenilato ciclase acumula AMPc

Em estudos realizados em moluscos (*Lymnaea stagnalis* e *Aplysia californica*) e nematóides (*Caenorhabditis elegans*) a metiotepina foi o antagonista mais potente utilizado para bloquear os efeitos da serotonina em receptores com homologia a família 5-HT<sub>1</sub> de mamíferos (Tierney, 2001).

Em estudo realizado na *Aplysia* por Dumitriu et al., (2006), a metiotepina foi altamente efetiva na inibição de receptores 5-HT acoplados a AC. Enquanto o es-

piperone, que bloqueia receptores 5-HT acoplados a PLC em mamíferos, não bloqueou os receptores 5-HT acoplados a AC neste molusco.

Conforme mostrado na Tabela 3, três genes de receptores de 5-HT foram clonados dos nematóides *Caenorhabditis elegans* e *Ascaris suum* (Tierney, 2001).

Tabela 3 – Tipos de receptores dos nematóides *Caenorhabditis elegans* e *Ascaris suum*. Adaptado de Tierney (2001).

Nematóides/ Receptor	Homologia a mamíferos	Mecanismo de Ação
<i>Caenorhabditis elegans</i> 5-HT <sub>-1Ce</sub>	receptor 5-HT <sub>1</sub>	inibiu a adenilato ciclase ↓ nos níveis de AMPc Inibe a <i>forskolin</i>
<i>Caenorhabditis elegans</i> 5-HT <sub>-2ACe</sub> e 5-HT <sub>-2Bce</sub> (gene com dois splice variante)	similar ao 5-HT <sub>2</sub>	↑ os níveis de Ca <sup>2+</sup>
<i>Ascaris suum</i> 5-HT <sub>Asc</sub>	família 5-HT <sub>2</sub> ?	-----

O receptor 5-HT do inseto *Drosophila melanogaster*, 5-HT-dro, foi o primeiro receptor 5-HT de invertebrado a ser sequenciado (Tabela 4) (Tierney, 2001). A comparação entre as sequências dos receptores 5-HT<sub>2β</sub> e 5-HT<sub>1α</sub> de artrópodes demonstrou que há um alto grau de conservação nas estruturas-chave dentro dos receptores, sugerindo que os mecanismos de sinalização dos receptores dos invertebrados devem ser similares aos dos vertebrados (Spitzer et al., 2008).

Tabela 4 – Tipos de receptores serotoninérgicos de *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Tierney (2001).

Receptor	Homologia a mamíferos	Mecanismo de Ação / Funções
5-HT-dro	49% - 5-HT <sub>1</sub>	modula o ritmo circadiano ↑adenilato ciclase ↑AMPC
5-HT-dro1	57% - 5-HT <sub>7</sub>	modula o ritmo circadiano ↑adenilato ciclase ↑AMPC
5-HT-dro2A	-----	papel no controle motor ↓adenilato ciclase ↑ fosfolipase C ↑ IP <sub>3</sub>
5-HT-dro2B	41% - 5-HT <sub>1A</sub>	papel no controle motor ↓adenilato ciclase, ↑fosfolipase C ↑ IP <sub>3</sub>

Em estudos realizados em insetos (*Drosophila melanogaster*) e nematóides (*Caenorhabditis elegans*) a ciproeptadina bloqueou os efeitos da serotonina em receptores com homologia a família 5-HT<sub>2</sub> de mamíferos (Tierney, 2001).

Em crustáceos dois receptores 5-HT foram identificados e clonados na lagosta *Panulirus interruptus*: 5-HT<sub>1αPan</sub> e 5-HT<sub>2βPan</sub> (Clark et al., 2004; Sosa et al., 2004) e no lagostim *Procambarus clarkii*: 5-HT<sub>1αPro</sub> e 5-HT<sub>2βPro</sub>, (Tabela 5) (Tierney, 2001; Spitzer et al., 2008).

Receptores com perfil farmacológico similar ao dos receptores 5-HT<sub>1</sub> de vertebrados, denominados 5-HT<sub>1-like</sub>, foram identificados nos camarões *Penaeus monodon* (Ongvarrasopone et al., 2006) e *Metapenaeus ensis* (Tiu et al., 2005), e no lagostim *Procambarus clarkii* (Lee et al., 2000; Calderón-Rosete et al., 2006). Receptores com perfil farmacológico semelhante aos receptores 5-HT<sub>2</sub> de vertebrados já foram descritos nos lagostins *P.clarkii* (Lee et al., 2000; Lee et al., 2001; Tierney e Mangiamele, 2001) e *Macrobrachium rosenbergii* (Meerata et al., 2006).

Tabela 5 – Tipos de receptores dos crustáceos *Panulirus interruptus* e *Procambarus clarkii*. Adaptado de Tierney (2001).

Crustáceo / Receptor	Homologia a mamíferos	Mecanismo de Ação
<i>Panulirus interruptus</i> 5-HT <sub>1αPan</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	Inibe a adenilato ciclase via Gi ↓ AMPc inibe a <i>forskolin</i>
<i>Panulirus interruptus</i> 5-HT <sub>2βPan</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	Ativa a proteína cinase C (PKC) ↑ IP <sub>3</sub> Não altera AMPc
<i>Procambarus clarkii</i> 5-HT <sub>1αPro</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	Inibe a adenilato ciclase via Gi ↓ AMPc inibe a <i>forskolin</i>
<i>Procambarus clarkii</i> 5-HT <sub>2βPro</sub>	5-HT <sub>2B</sub>	Ativa a proteína cinase C (PKC) ↑ IP <sub>3</sub> Não altera AMPc

No estudo detalhado para a determinação do perfil farmacológico dos receptores 5-HT da lagosta *P. Interruptus* (Pan) e do lagostim *P. Clarkii* (Pro), Spitzer et al. (2008) avaliaram os efeitos de vários agonistas e antagonistas destes receptores sobre os níveis de AMPc e IP<sub>3</sub> intracelulares. Comparando as duas espécies, constataram que a potência dos agonistas era sempre cerca de 5 vezes menor na lagosta. O perfil farmacológico dos antagonistas sobre os receptores também parece ser bem conservado, sendo verificado que cinanserina, butaclamol, ritanserina e metiotepina bloqueiam o receptor 5-HT<sub>2β</sub>, mas não os receptores 5-HT<sub>1α</sub>.

A serotonina é um potente regulador da neurogênese adulta em crustáceos decápodes, tal como em vertebrados. Estudos realizados por Zhang et al. (2011) no lagostim *P. clarkii*, demonstraram que a metiotepina suprime a neurogênese agindo em receptores 5-HT<sub>2B</sub>. Neste estudo, a metiotepina foi o antagonista escolhido devido a estudos anteriores realizados neste lagostim por Spitzer et al. (2008)

onde a metiotepina apresentou a maior eficácia entre 29 antagonistas testados em receptores 5-HT<sub>2B</sub>, e nenhuma atividade em receptores 5-HT<sub>1A</sub>.

A serotonina possui um papel importante no controle da postura em crustáceos, pois a sua administração causa marcante alteração postural, caracterizada por uma forte flexão dos membros e abdome (Fingerman e Nagabhushanam, 1992; Tierney e Mangiamale, 2001). Esta postura, conhecida como *5-HT-posture*, já foi observada no caranguejo *Neohelice granulata* e no lagostim *Parastacus defossus* após a administração de serotonina ( $2,6 \times 10^{-6}$  moles/caranguejo (Vinagre et al., 2004).

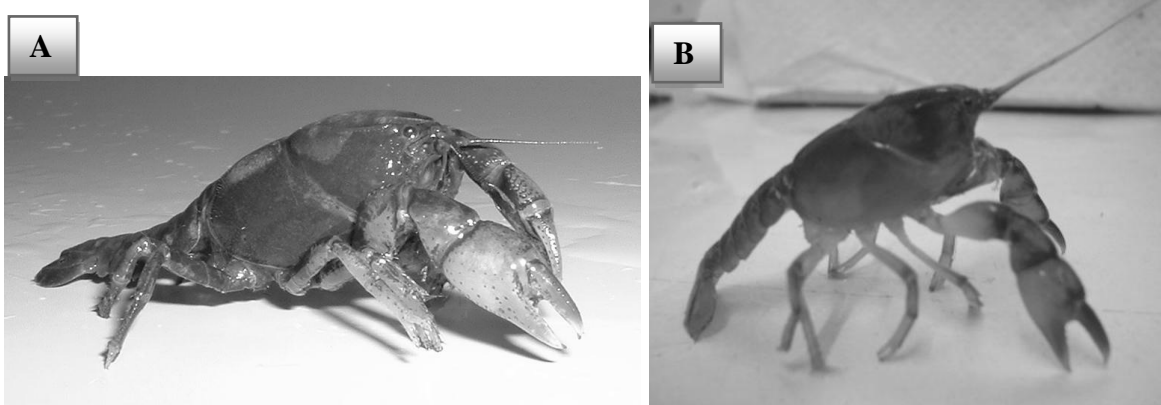


Figura 2- Postura do lagostim *Parastacus defossus* 30 minutos após a administração de solução fisiológica para crustáceos (A) ou serotonina (B)  $2,6 \times 10^{-6}$  moles/lagostim. Adaptado de Vinagre et al., (2004).

A comparação entre os efeitos da serotonina e de quatro agonistas de receptores serotoninérgicos sobre a postura corporal e a agressividade no lagostim *Procambarus clarkii*, demonstrou que o mCPP (1-3-cloro-fenil-piperazina-dihidroclorado), agonista de receptores 5HT<sub>2</sub> de vertebrados, foi o agonista que apresentou efeito mais parecido ao da serotonina em relação à postura dos animais (Tierney e Mangiamale, 2001). Estes autores sugerem que as alterações posturais observadas após a administração de serotonina em crustáceos podem ser



utilizadas como um ensaio biológico para estudos comportamentais nestes animais.

No lagostim *Orconectes rusticus*, a existência de um sistema de recompensa comportamental foi demonstrada através da administração de cocaína e D-anfetamina (Huber, 2005). Segundo estes autores, apesar das grandes diferenças neuroanatômicas entre vertebrados e invertebrados, existem muitas semelhanças neuroquímicas, o que reforça a importância da investigação dos efeitos das monaminas nestes animais.

O Hormônio Hiperglicemiante de Crustáceos (CHH) é considerado o principal hormônio controlador do metabolismo de carboidratos em crustáceos. Este hormônio é produzido principalmente no órgão X e armazenado na glândula do Seio, localizados nos pedúnculos oculares destes animais. Este hormônio também pode ser sintetizado em outros locais tais como o órgão pericárdico (PO), o intestino e o sistema nervoso ventral, porém o CHH intestinal é considerado uma forma variante do CHH do pedúnculo ocular e parece não estar envolvido no controle do metabolismo de carboidratos (Fanjul-Moles, 2006). O procedimento de apedunculção, ou remoção bilateral dos pedúnculos oculares, é bastante utilizado em fazendas de aquacultura e em protocolos experimentais que visam estimular a reprodução dos crustáceos. Este procedimento também pode causar hipoglicemia devido à remoção da principal fonte de CHH (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; Vinagre, 1999).

A administração de serotonina causou hiperglicemia em todas as espécies de crustáceos já testados, sugerindo que além do CHH, a serotonina também pode

regular os valores de glicose hemolinfática (Bauchau e Mengeot, 1966; Fingerman e Nagabhushanam, 1992; Lee et al., 2000; Lorenzon et al., 2004; Komali et al., 2005; Reddy e Pushpalatha, 2007; Sathyanandam et al., 2008). Estudos comparando os efeitos da administração de serotonina em animais intactos e apedunculados demonstram que a serotonina sempre causa hiperglicemia em animais intactos, porém este efeito foi obtido somente em alguns animais apedunculados (Lee et al., 2000; Zanutelli et al., 2002; Komali et al., 2005; Reddy e Pushpalatha, 2007; Sathyanandam et al., 2008). Estes resultados, associados a função neuromoduladora da serotonina, sugerem que ela atue no pedúnculo ocular dos crustáceos, estimulando a secreção de CHH (Lee et al., 2000; Komali et al., 2005; Reddy e Pushpalatha, 2007; Sathyanandam et al., 2008).

No caranguejo *Neohelice 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) (Figura 3). Estes resultados sugerem que a serotonina pode exercer efeitos sobre a glicemia aumentando a secreção de CHH ou apresentar efeitos diretos sobre tecidos-alvo periféricos (Zanutelli et al., 2002).

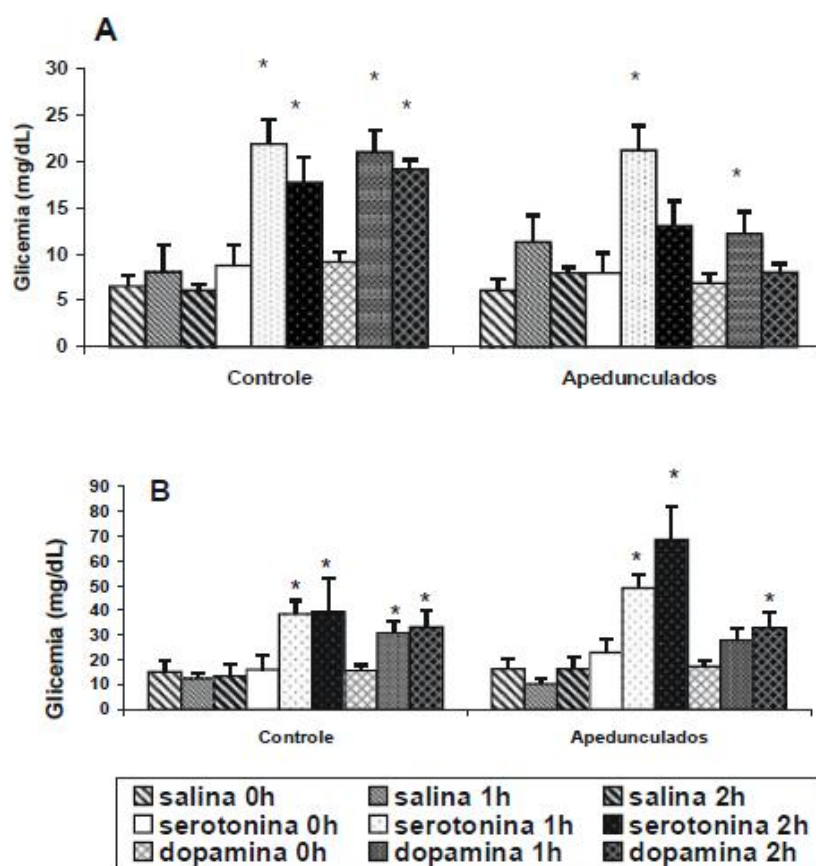


Figura 3- Concentração de glicose na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata*, intactos (controle) e apedunculados, alimentados com dieta RP (A) e RC (B), 60 e 120 minutos após a administração de salina, serotonina ( $2,6 \times 10^{-6}$  moles/caranguejo) ou dopamina ( $5,3 \times 10^{-7}$  moles/caranguejo). Os valores representam as médias e as barras verticais, os erros padrões. \* diferença significativa para  $p < 0,05$ . Adaptado de (Zanotelli et al., 2002).

O efeito hiperglicêmico da serotonina em *N. granulata* foi confirmado por Santos et al. (2001) em animais intactos. Estes autores constataram que este efeito também poderia ser observado após a administração de fluoxetine, inibidor da recaptção de serotonina em terminais sinápticos.

Trabalho realizado por Lorenzon et al. (2004) demonstrou que a ciproeptadina foi mais efetiva que o antagonista cetanserina quando utilizada no *Astacus Lepidodactylus*, bloqueando receptores de serotonina do tipo 5-HT<sub>2</sub> –like, inibindo a ação hiperglicemiante da serotonina observada neste crustáceo.

Evidências indicam que a serotonina e a dopamina também estariam envolvidas no controle da osmorregulação em crustáceos (Morris, 2001; Halperin et al., 2004). O caranguejo *N. granulata* é um interessante modelo biológico para estudar as adaptações fisiológicas induzidas por estresse osmótico, porque ele habita um ambiente estuarino (Da Silva e Kucharski, 1992; Oliveira e Da Silva, 2001; Bianchini et al., 2008). Em seu habitat, este caranguejo é exposto a um grande número de desafios ambientais tais como mudanças na temperatura, pressão parcial de oxigênio ambiental, disponibilidade e composição de alimentos, e a salinidade de acordo com cada estação do ano (Kucharski e Da Silva, 1991).

As brânquias anteriores dos caranguejos eurialinos realizam a função da troca gasosa, enquanto que as brânquias posteriores estão relacionadas a ajustes necessários para osmorregulação, entre outras funções como a homeostase do cálcio, excreção de amônia e regulação do pH extracelular (Gilles, 1982; Siebers et al., 1982; Genovese et al., 2000; Luquet et al., 2002; Freire et al., 2008). Ambas as brânquias anteriores e posteriores estão em contato direto com água dentro das câmaras branquiais, onde a salinidade varia de acordo com o meio ambiente.

As brânquias de crustáceos são constituídas por uma superfície amplificada com interface com permeabilidade diferencial utilizada para a troca de íons e de gases entre os meios interno e externo. Uma fina cutícula recobre toda a superfície da brânquia, revestindo o epitélio de camada única, posicionada sobre uma lâmina basal. Além de células não epiteliais, como os fibroblastos, neurônios, células endoteliais, células glandulares e “nefrócitos”, cinco tipos diferentes de células podem ser distinguidas no epitélio branquial: células finas, espessas (também chamadas ionócitos ou osmorregulatórias em caranguejos), atenuadas, pilares e de borda (Freire et al., 2008).

Em certas espécies hiperosmorregulatórias, as células finas aparecem nas brânquias posteriores perto das células espessas. As células finas parecem constituir o epitélio respiratório e também podem participar de outros processos fisiológicos como a excreção de amônia. Células espessas, contendo grande número de mitocôndrias, com membrana na forma de folhetos ou microvilosidades, apresentam características de células transportadoras de íons, chamadas também de ionócitos ou células osmorregulatórias, localizadas nas brânquias posteriores de várias espécies de crustáceos. Nas brânquias de caranguejos osmoconformadores, o epitélio é formado predominantemente por células finas e células pilares. Nas brânquias posteriores de caranguejos hiperosmorregulatórios, é formado por células espessas e células pilares (Freire et al., 2008).

Além do papel da troca gasosa, as brânquias são essenciais na homeostase iônica e osmótica. Em crustáceos que habitam regiões com água do mar diluída ou água doce, a absorção de NaCl transbranquial constitui um elemento do processo hiperosmorregulatório enquanto a excreção de água compreende o outro. O modelo de transporte de absorção de NaCl transbranquial está representado na Figura 4 (Freire et al., 2008).

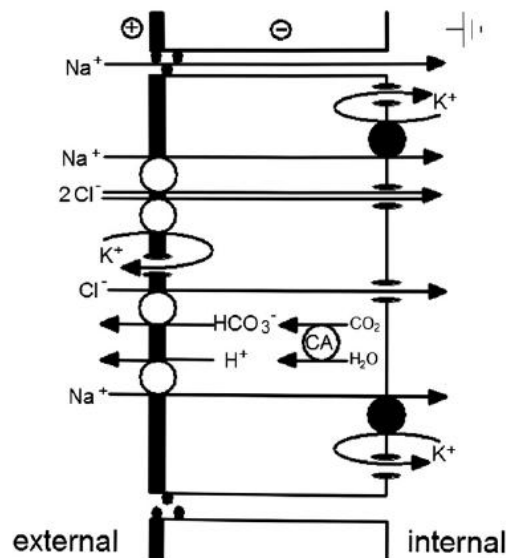


Figura 4 – Mecanismo de transporte para a absorção de NaCl transbranquial através das brânquias de caranguejos hiperosmorregulatórios. Adaptada de (Freire et al., 2008). Processo acoplado de absorção de NaCl via co-transporte apical de  $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ . O  $\text{Na}^+$  é bombeado através da membrana basolateral pela  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Canais de  $\text{K}^+$  basolateral garantem um potencial elétrico negativo nas células, suportando a saída de  $\text{Cl}^-$  através de canais de  $\text{Cl}^-$  basolateral. Canais apicais de  $\text{K}^+$  hiperpolarizam a célula, deixando seu interior mais negativo, favorecendo o co-transporte com íons  $\text{K}^+$ , e fornecendo a natureza eletrogênica total do transporte. A voltagem positiva do lado externo transbranquial pode servir como uma força motriz para a absorção paracelular de  $\text{Na}^+$  para garantir a absorção equimolar de NaCl. Além disso, uma fração aparentemente variável no processo de absorção de NaCl ocorre via trocadores apicais de ânions e cátions. Os substratos celulares para estas trocas são fornecidos via hidratação de  $\text{CO}_2$  catalisada pela anidrase carbônica.

A regulação da absorção de NaCl transbranquial por fatores hormonais e não-hormonais (auto-regulação) tem recebido uma atenção crescente ao longo da última década. A autoregulação pela osmolalidade hemolinfática ocorre tanto em crustáceos hiperosmorreguladores fortes como fracos. Enquanto nos hiperosmorreguladores fortes, como o *E. sinensis*, os efeitos das variações osmóticas sugerem regulação na atividade da bomba de  $\text{H}^+$  tipo V (vacuolar),  $\text{V}(\text{H}^+)$ -ATPases, apicais e canais de  $\text{Na}^+$ . No *N. granulata*, um hiperosmorregulador fraco, a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase é que parece ser modificada. No *E. sinensis*, um fator do pedúnculo estimula a absorção de NaCl via AMPc celular e PKA, ativando  $\text{V}(\text{H}^+)$ -

ATPases apicais e abrindo canais de  $\text{Na}^+$  (Freire et al., 2008). No *P. Marmoratus*, um hiperosmorregulador fraco, o CHH estimula a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e absorção de  $\text{Na}^+$ . A dopamina estimula a absorção de NaCl em ambos hiperosmorreguladores aumentando também a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Freire et al., 2008).

A absorção ativa de NaCl em câmaras branquiais de caranguejos com respiração aérea é regulada por hormônios. Em *G. natalis*, a absorção de  $\text{Na}^+$  e atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase são estimuladas pela serotonina, no entanto, este estímulo não é mediado por AMPc. Em contraste, no anomuro *B. latro*, a absorção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são inibidas pela dopamina, mediado pelo AMPc e resulta na diminuição da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Morris 2001; Freire et al., 2008).

Em brânquias de peixes teleósteos, a serotonina age de forma parácrina sobre a musculatura lisa vascular e células pilares, que também contém filamentos contráteis. Estudos revelam que a serotonina aumenta a resistência branquial, combinada com aumento na perfusão da via artério-venosa e seio central entre as brânquias, através de receptores  $5\text{-HT}_2$ , enquanto a inibição dos receptores  $5\text{-HT}_1$  não reduz a vasoconstrição induzida pela serotonina nos vasos sanguíneos das brânquias (Sundin et al., 1998; Pelster et al., 2012).

Conforme exposto, fica evidente que a serotonina possui funções importantes em vários processos fisiológicos de crustáceos, porém há carência de informações sobre os receptores serotoninérgicos e mecanismos celulares desencadeados pela ligação da serotonina aos seus receptores.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho, tendo em vista a importância biológica da serotonina, foi investigar a localização e o perfil fisiológico e farmacológico dos receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo *N.granulata*.

Para isto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1) Verificar o efeito da serotonina e dos antagonistas de receptores 5-HT<sub>1</sub> (metiotepina) e 5-HT<sub>2</sub> (ciproeptadina) sobre o metabolismo de carboidratos, características histológicas e postura de caranguejos *N. granulata*, alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP);

2) Identificar a localização dos receptores de 5-HT nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo pela técnica de *binding*, utilizando serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>);

3) Identificar o perfil fisiológico dos receptores de serotonina nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo pela técnica de *binding*, utilizando antagonistas de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>;

4) Identificar a presença de terminações nervosas e de serotonina em brânquias anteriores e posteriores.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e manutenção dos animais

Caranguejos *Neohelice granulata* DANA, 1851 (Crustacea, Brachyura, Varunidae) machos e em período de intermuda, foram capturados durante a primavera e o verão (2011 e 2012), na margem leste da Lagoa de Tramandaí, no município de Imbé/RS, na área do Centro de Estudos Costeiros Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). 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, duas vezes por semana.

#### 3.2. 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.

### **3.3. Estudos “*in vivo*”**

#### **3.3.1. Efeitos da injeção de serotonina e dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre o metabolismo de carboidratos e a postura**

Para este estudo foram utilizados animais em dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP) em cada experimento. No dia do experimento, os animais eram separados em gaiolas individuais, previamente numeradas, e neste momento era coletada a primeira amostra de hemolinfa, na articulação das quelas, utilizando-se seringas descartáveis de 1mL (tipo insulínica) contendo anti-coagulante oxalato de potássio 10%. As amostras eram transferidas para tubos plásticos tipo Eppendorf (capacidade para 1,5mL, fundo cônico) e congeladas até o dia da dosagem da glicemia. Após este procedimento, os animais permaneciam por aproximadamente 3 horas no aquário para diminuição do estresse causado pela manipulação.

Após este período, os animais foram divididos em quatro grupos:

1- Controle: receberam 100µL de solução fisiológica para crustáceos (SFC), e após 30 minutos, receberam novamente 100µL de SFC.

2- Serotonina: receberam 100µL de SFC e após 30 minutos, 100µL de serotonina (5-hydroxytryptamine creatine sulfate complex – Sigma)  $5,69 \times 10^{-2}$  moles/ caranguejo;

3- Metiotepina: receberam 100 $\mu$ L do antagonista metiotepina (Methiothepin mesylate salt – Sigma)  $2,21 \times 10^{-2}$  moles/ caranguejo, e após 30 minutos, 100 $\mu$ L de serotonina ( $5,69 \times 10^{-2}$  moles/ caranguejo);

4- Ciproeptadina: receberam 100 $\mu$ L do antagonista ciproeptadina (Cyproheptadine hydrochloride – Sigma)  $10^{-3}$  moles/ caranguejo e após 30 min, 100 $\mu$ L de serotonina ( $5,69 \times 10^{-2}$  moles/ caranguejo).

A serotonina e os antagonistas foram diluídos em 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) adaptada à partir da solução descrita por Loret e cols. (1989), reduzindo o NaCl para 300mM, tornando a solução isosmótica (750mOsm/L) em relação à hemolinfa do *N. granulata*, preparada com o pH 7,8 e ajustada com tampão Tris (0,1M) – HCl (6N), pH8,0 e NaOH 1N.

Após 60 ou 120 minutos da administração das injeções de serotonina, os animais foram fotografados para obtenção do registro das alterações posturais e da atividade, seguida da coleta da segunda amostra de hemolinfa conforme descrito anteriormente.

Posteriormente, era realizada a crioanestesia e sacrifício do animal para retirada das amostras de brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo mandibular. As amostras eram utilizadas para a determinação da concentração de glicogênio e para as análises histológicas. As amostras para glicogênio eram transferidas para tubos plásticos tipo Eppendorf (capacidade para 2,0mL, fundo redondo) e congeladas até o dia da dosagem do glicogênio. As amostras para as análises histológicas foram processadas pela técnica de hematoxilina-eosina. Amostras de músculo e de hepatopâncreas foram submetidas

à técnica de PAS (*Periodic Acid Schiff Reaction*) para a identificação de depósitos de carboidratos.

### **3.3.2. Curva de tempo para ligação de serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>) em tecidos-alvo periféricos**

Com o objetivo de verificar a possível ligação nos receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo do caranguejo *N. granulata* foi utilizada a técnica de *binding* com serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>). Para a curva de tempo de ligação, foram utilizados os tempos de 15, 30 e 60 minutos.

Os animais foram separados em gaiolas individuais, previamente numeradas, e cada um recebeu a injeção de 5-HT-H<sup>3</sup> ([<sup>3</sup>H]5-HT(5-hydroxy[G-3H] tryptamine creatinine sulfate 10-20Ci/mmol) na concentração de 200.000dpm, diluída em 100µL de SFC, na articulação das quelas.

Após 15, 30 ou 60 minutos, eram retiradas as amostras de hemolinfa, transferidas para tubos plásticos tipo Eppendorf e colocadas no gelo para conservação. Em seguida, os animais eram crioanestesiados para sacrifício e retirada dos seguintes tecidos: coração, músculo mandibular, hepatopâncreas, brânquias anteriores e posteriores.

As amostras de tecidos eram lavadas com SFC, secadas em papel filtro e colocadas em Eppendorfs (capacidade para 2,0mL) contendo previamente 500 µL de SFC. Os Eppendorfs eram pesados antes e após colocar as amostras. As amostras eram mantidas sob refrigeração.

A homogeneização dos tecidos era realizada no macerador OMNI-MIXER, e logo após, uma alíquota de 250µL do homogeneizado era transferida para vials de vidro previamente preenchidos com 4,5mL de coquetel de cintilação (Tolueno-

Triton 2:1, PPO0,4%, POPOP 0,01%) para realizar a contagem da radioatividade. Nas amostras de hepatopâncreas foram adicionados 100µL de água destilada para desturvar as amostras. A hemolinfa não passava pelo processo de homogeneização e era transferida uma alíquota de 100µL diretamente para o vial.

As amostras eram mantidas sob refrigeração *overnight* e a radioatividade era medida no dia seguinte, através de um contador beta (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).

### **3.3.3. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos**

Para este experimento foi utilizada a técnica de *binding* com 5-HT-H<sup>3</sup>, serotonina (5-HT) e dopamina com o objetivo de determinar a ligação específica da serotonina em receptores nos tecidos-alvo do caranguejo.

Os fármacos foram dissolvidos em uma solução fisiológica de crustáceo acrescida de 5-HT-H<sup>3</sup> (SFCT) na concentração de 2.000.000 dpm/mL. Foram utilizados animais em dieta RC ou RP, os quais foram subdivididos em três grupos:

- 1- SFCT: receberam 100µL de 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm);
- 2- Serotonina: receberam 100µL de 5-HT ( $5,69 \times 10^{-3}$  moles/caranguejo) e 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm);
- 3- Dopamina: receberam 100µL de dopamina (3,4 Dihydroxyphenylethylamine hydrochloride - Sigma)  $5,3 \times 10^{-3}$  moles/caranguejo e 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm);

Os animais receberam as injeções das soluções na articulação das quelas, e após 30 minutos, foram retiradas as amostras de hemolinfa e em seguida, os animais foram crioadestesiados e retirados os tecidos descritos anteriormente, assim como a homogeneização e a quantificação da radioatividade.

### **3.3.4. Efeito dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>**

A técnica de *binding* foi realizada para verificar a inibição da ligação da serotonina em receptores nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo com 5-HT-H<sup>3</sup>, juntamente com os antagonistas metiotepina e ciproeptadina. Foram utilizados animais de ambas as dietas, os quais foram subdivididos em três grupos:

1- SFCT: receberam 100µL de SFC e após 30 min, 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm/100µL de SFC);

2- Metiotepina: receberam 100µL de metiotepina ( $2,21 \times 10^{-2}$  moles/caranguejo) e após 30 min, 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm/100µL de SFC);

3- Ciproeptadina: receberam 100µL de ciproeptadina ( $\times 10^{-3}$  moles/caranguejo) e após 30 min, 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm/100µL de SFC);

Os animais receberam as injeções das soluções na articulação das quelas, e após 30 minutos, foram retiradas as amostras de hemolinfa e em seguida, os animais foram crioadestesiados e retirados os tecidos descritos anteriormente, assim como a homogeneização e a quantificação da radioatividade.

### **3.3.5. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo sem aclimatação e dieta**

Caranguejos machos e em período de intermuda, foram capturados no período da manhã, no dia 23/11/2012, na margem leste da Lagoa de Tramandaí, no município de Imbé/RS. A temperatura da água da lagoa era de 25°C, salinidade de 12‰ e pH de 7,43. Após a captura, realizada manualmente, os animais foram colocados em caixas plásticas, contendo água do próprio local, e transportados até o LaMEC. Ao chegarem, no final da manhã, os animais foram mantidos nas

mesmas caixas, contendo a água da lagoa e aeração constante, em uma sala com temperatura de 25°C e fotoperíodo natural. Os caranguejos não foram alimentados. Na manhã seguinte, foi realizado o experimento.

Foi realizada a técnica de *binding* com 5-HT-H<sup>3</sup> e serotonina, com o objetivo de verificar a ligação em receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo do caranguejo *N. granulata* sem o período de aclimação e tratamento com a dieta. Foram utilizados dois grupos de animais:

1- SFCT: receberam 100µL de 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm);

2- Serotonina: receberam 100µL de 5-HT (5,69x10<sup>-2</sup> moles/caranguejo) e 5-HT-H<sup>3</sup> (200.000dpm);

Os animais receberam as injeções das soluções na articulação das quelas, e após 30 minutos, foram retiradas as amostras de hemolinfa e em seguida, os animais foram crioanestesiados e retirados os tecidos descritos anteriormente.

A homogeneização dos tecidos era realizada no macerador OMNI-MIXER, e logo após, era pipetado uma alíquota de 100µl das amostras homogeneizadas e de hemolinfa, em vials de vidro previamente preenchidos com 2,5mL de coquetel de cintilação para realizar a contagem da radioatividade. Foram adicionados 50µl de água destilada em todos os vials para desturvar as amostras. A quantificação da radioatividade foi medida conforme descrito anteriormente.

### **3.4. Estudos “*in vitro*”**

#### **3.4.1. Curva de tempo para serotonina e antagonistas nas brânquias anteriores e posteriores**

Estudo realizado com o objetivo de determinar o tempo adequado para a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no sistema *in vitro*. Utilizamos para cada experimento animais em dieta RC ou RP.

No dia do experimento, os animais eram crioanestesiados para retirada dos pares de brânquias anteriores e posteriores, e cada par era colocado em tubo plástico tipo Eppendorf (2,0mL, fundo redondo), contendo 1,0mL de SFC ou com 0,9mL de SFC acrescido de 0,1mL de metiotepina ou ciproeptadina. Logo após, os tubos eram aerados com 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, as brânquias eram retiradas dos tubos, secadas em papel filtro e colocadas em frascos de plástico identificados contendo meio de incubação de acordo com cada tratamento.

Foi preparado para o meio de incubação, uma solução fisiológica de crustáceo (SFCT) acrescida de 5-HT-H<sup>3</sup> na concentração de 2,5µCi, dissolvida em 10mL de SFC.

Foram utilizados quatro tratamentos em três tempos diferentes: 5, 15 e 30 minutos:

- SFCT: 1,0 mL de SFC na pré-incubação e 1,0 mL de SFCT na incubação.
- Serotonina: 1,0 mL de SFC na pré-incubação e 0,9mL SFCT + 0,1mL de 5-HT (10<sup>-4</sup>M) na incubação.
- Ciproeptadina: 0,9mL de SFC acrescido de 0,1mL de ciproeptadina (10<sup>-4</sup>M) na pré-incubação e 0,9mL de SFCT + 0,1mL de ciproeptadina (10<sup>-4</sup>M) na incubação.



- Metiotepina: 0,9mL de SFC acrescido de 0,1mL de metiotepina ( $10^{-4}$ M) na pré-incubação e 0,9mL de SFTC + 0,1mL de metiotepina ( $10^{-4}$ M) na incubação.

Os tubos plásticos contendo as brânquias eram aerados por 30 segundos e incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante, a 25°C durante 5, 15 ou 30 minutos. Após, os tubos eram retirados do banho e colocados no gelo.

As amostras eram retiradas cuidadosamente dos frascos, lavadas com SFC, secadas em papel filtro e pesadas. Posteriormente, as amostras eram transferidas para viais de plástico, previamente preenchidos com 2,5mL de coquetel de cintilação, eram refrigeradas *overnight*, e a contagem da radioatividade era realizada no dia seguinte. A quantificação da radioatividade foi medida conforme descrito anteriormente.

### **3.4.2. Curva de dose de serotonina nas brânquias anteriores e posteriores**

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar a curva de dose da serotonina. Foram utilizados animais em dieta RC ou RP para cada experimento.

No dia do experimento, os animais eram crióanestesiados para retirada dos pares de brânquias anteriores e posteriores; os quais eram pré-incubados com 1,0mL de SFC conforme descrito anteriormente. Após a pré-incubação, as brânquias eram colocadas em frascos identificados contendo meio de incubação de acordo com cada tratamento. Como meio de incubação, foi preparada SFCT.

Foram utilizados na incubação oito tratamentos, com quatro pares de brânquias em cada, para ambas as brânquias:

- SFCT: 1,0 mL de SFCT.

- Doses de serotonina: 0,9mL SFTC + 0,1mL de serotonina nas concentrações de  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M,  $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-10}$ M,  $10^{-11}$ M e  $10^{-12}$ M.

Os tubos plásticos contendo as brânquias eram incubados durante 30 minutos e logo após refrigerados.

As amostras e a quantificação da radiação foram processadas conforme descrito anteriormente. Os resultados foram transformados em porcentagem em relação ao grupo SFCT e, analisados pelo teste de correlação de Pearson.

### **3.4.3. Curvas de dose de metiotepina e de ciproeptadina nas brânquias anteriores e posteriores**

Este estudo foi realizado com o objetivo de determinar as curvas de doses dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina. Foram utilizados animais em dieta RC ou RP para cada experimento.

Os procedimentos para a crioanestesia, retirada dos tecidos e pré-incubação foram os mesmos descritos para a curva de dose da serotonina.

Após estes procedimentos, os pares de brânquias eram retirados dos tubos, e colocados em frascos identificados contendo meio de incubação de acordo com cada tratamento. Foi preparado SFCT para o meio de incubação.

Foram utilizados nove tratamentos na incubação: SFCT, doses de ciproeptadina e doses de metiotepina, com três pares de brânquias em cada, para ambas as brânquias. Tratamentos:

- SFCT: 1,0 mL SFCT.
- Doses de ciproeptadina: 0,9mL de SFTC + 0,1mL de ciproeptadina nas concentrações de  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M e  $10^{-7}$ M.
- Doses de metiotepina: 0,9mL de SFTC + 0,1mL de metiotepina nas concentrações de  $10^{-4}$ M,  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M e  $10^{-7}$ M.

Os tubos plásticos contendo as brânquias eram incubados durante 30 minutos e logo após refrigerados.

As amostras e a quantificação da radioatividade foram processadas conforme descrito anteriormente.

### **3.5 Análises bioquímicas**

#### **3.5.1. Determinação da glicemia**

A concentração de glicose das amostras de hemolinfa foi determinada pela técnica da glicose-oxidase, utilizando um *kit* de determinação espectrofotométrica de *glicose liquiform* (Labtest) no comprimento de onda de 505nm (espectrofotômetro - PG Instruments - T60 U). Os resultados foram expressos em mg de glicose/dL de hemolinfa.

#### **3.5.2. Determinação do glicogênio**

A extração de glicogênio nas amostras de tecidos foi realizada pelo método de van Handel (1965). Após hidrólise ácida conforme técnica de Geary et al (1981), a concentração de glicogênio foi determinada pela concentração de glicose liberada, utilizando a metodologia descrita acima. Os resultados foram expressos em mg de glicose/g de tecido.

#### **3.5.3. Determinação da radioatividade das amostras**

Nos estudos *in vivo* a quantificação da radioatividade emitida pelos tecidos foi expressa pela relação do tecido pela hemolinfa (T/H) (dpm/g de tecido/100 $\mu$ L de hemolinfa).

Nos estudos *in vitro* a quantificação da radioatividade emitida pelos tecidos foi expressa em dpm/g de tecido.

### **3.6 Análises histológicas**

#### **3.6.1. Coloração com Hematoxilina e Eosina (H.E.)**

Para o estudo histológico dos tecidos periféricos do caranguejo, amostras do hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias anteriores e posteriores foram retiradas dos animais e imediatamente fixadas em Bouin por 24 horas.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente (70, 80, 90, 96 e 100%) durante 1 minuto cada, diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica – RM 2125). Os cortes finos com espessura de 7µm foram distendidos sobre lâminas histológicas, desparafinados em xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (100, 96, 90, 80 e 70%), durante 1 minuto cada, seguido de enxágue em água destilada.

As lâminas foram coradas com hematoxilina por 10 minutos, lavadas em água corrente por 10 minutos, coradas com eosina por 2 minutos e novamente lavadas em água corrente até que a água estivesse limpa.

Para finalizar o processo, as lâminas foram desidratadas 3 vezes em álcool 100%, e diafanizadas por 3 vezes em xilol. As lâminas foram montadas com balsamo do Canadá e lamínulas. A observação foi realizada em microscópio óptico (NIKON Eclipse E600). Após a observação, alguns cortes foram selecionados e fotografados com o auxílio de uma câmara digital (SONY DSC-W1) acoplada ao microscópio.

### **3.6.2. Coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS);**

Para a determinação histológica do glicogênio presente no hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias anteriores e posteriores, amostras destes tecidos foram retiradas dos animais e imediatamente fixadas em Bouin por 24 horas.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol, impregnadas e incluídas em parafina.

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Leica – RM 2125). Os cortes finos com espessura de 7 $\mu$ m foram distendidos sobre lâminas histológicas, desparafinados em xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (100, 96, 90, 80 e 70%), durante 1 minuto cada, seguido de enxágue em água destilada.

As lâminas foram imersas em solução aquosa de ácido periódico a 0,5% por 5 minutos e lavadas em água destilada por 1 minuto. As lâminas foram coradas com reagente de Schiff por 15 a 20 minutos, lavadas em água corrente por 20 minutos, coradas com hematoxilina por 5 minutos e novamente lavadas em água corrente por 10 minutos.

Para finalizar o processo, as lâminas foram desidratadas 3 vezes em álcool 100%, e diafanizadas por 3 vezes em xilol. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas. A observação foi realizada em microscópio óptico (NIKON Eclipse E600). Após a observação, alguns cortes foram selecionados e fotografados com o auxílio de uma câmara digital (SONY DSC-W1) acoplada ao microscópio.

### **3.6.3. Observação do sistema nervoso com coloração azul de metileno**

Para este experimento, selecionamos dois caranguejos que receberam injeção de 200µL de azul de metileno (0,2% diluído em SFC) na articulação das quelas, utilizando seringas descartáveis de 1mL (tipo insulínica).

Após 15 minutos, os caranguejos foram crioanestesiados por 30 minutos e então mortos. A carapaça do caranguejo foi retirada para observação da coloração dos tecidos em geral e do sistema nervoso, e em seguida, a solução de azul de metileno mais concentrada (0,5% diluído em SFC) foi gotejada cuidadosamente sobre os tecidos do animal. Os animais foram mantidos sob refrigeração por 2h em geladeira.

Após este período, o excesso do corante foi lavado com solução de molibdato de amônia 10% (2g/20mL), seguida da retirada das brânquias anteriores e posteriores. Os tecidos foram imersos na solução de molibdato de amônia por 2h sob refrigeração.

As amostras foram retiradas da solução e fixadas em paraformaldeído tamponado (pH 7,4) permanecendo *overnight* a 4°C. As amostras foram transferidas para recipientes contendo sacarose tamponada (15%) e após 24h em geladeira, a sacarose 15% foi substituída por sacarose 30%, onde as amostras permaneceram até o dia do preparo para os cortes em criostato.

Os cortes histológicos foram obtidos em criostato (LEICA, CM 1850), na temperatura de -19°C, com espessura de 50µm, e coletados de modo seriado sobre lâminas histológicas. Após a secagem, as lâminas foram desidratadas 2 vezes em álcool 100%, 2 vezes em álcool 96% e diafanizadas por 2 vezes em xilol, 30 segundos cada. Para finalizar o processo, as lâminas foram desidratadas 3 vezes em álcool 100%, e diafanizadas por 3 vezes em xilol. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas. A observação foi realizada em microscópio

óptico (NIKON Eclipse E600). Após a observação, alguns cortes foram selecionados e fotografados com o auxílio de uma câmara digital (SONY DSC-W1) acoplada ao microscópio.

#### **3.6.4. Imunoistoquímica**

Para a técnica de imunoistoquímica, amostras de brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *N. granulata* e amostras de tronco encefálico e medula espinal de ratos *Wistar* (usadas como controle positivo da técnica) foram retiradas dos animais e fixadas em uma solução de zinco fixadora por 36h à temperatura ambiente (Csizmadia, et al, 2009). Após a fixação, os tecidos foram desidratados em série alcoólica crescente (90, 96 e 100%), durante 1 minuto cada, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina para posterior secção horizontal em micrótomo (Leica – RM 2125) com espessura de 7µm .

Os cortes foram distendidos sobre lâminas histológicas, desparafinados em xilol, hidratados em série alcoólica decrescente (100, 96 e 90%) durante 1 minuto, seguido de enxágue em água destilada finalizando em tampão fosfato salino, pH 7,4 (PBS). Em seguida, os cortes foram submetidos ao procedimento de imunoistoquímica para a detecção do neurotransmissor serotonina.

Inicialmente, os cortes receberam um pré-tratamento para bloqueio da atividade da peroxidase endógena e sítios inespecíficos de união dos anticorpos, antes da incubação com o anticorpo primário. Os cortes permaneceram incubados por 30 minutos em uma solução de metanol 10% preparada em solução de peróxido de hidrogênio 3% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%:10mL metanol) à temperatura ambiente. Após duas lavagens com tampão fosfato salino acrescido de Triton 0,2% (PBS-T), os cortes foram

pré-incubados por 30 minutos com soro normal de cabra 3% (Millipore), diluído em PBS-T, para bloquear os sítios de ligação inespecíficos.

Em seguida, iniciou-se a incubação com o anticorpo primário anti-serotonina (Millipore) desenvolvido em coelho, e diluído em PBS-T na concentração de 1:500, ficando sob refrigeração em geladeira *overnight*. Os cortes foram lavados duas vezes em PBS-T por 15 minutos. Posteriormente, os cortes foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente com um anticorpo secundário IgG anti-coelho desenvolvido em cabra (Sigma) na concentração de 1:50 em PBS-T. Os cortes foram lavados por mais duas vezes em PBS-T e então incubados com o complexo PAP (peroxidase antiperoxidase) (Sigma) 1:500 por 90 minutos. O complexo PAP reage imunologicamente com o anticorpo secundário, que por sua vez, reconhece o anticorpo primário. O PAP combina-se com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), resultando em um complexo HRP- $H_2O_2$ , que pode oxidar diferentes cromógenos. A oxidação desses cromógenos resulta em um precipitado corado. Os cortes foram novamente lavados duas vezes em PBS-T por 15 minutos.

Após este período, foi realizada a revelação da reação imunoistoquímica, incubando-se os cortes em uma solução contendo o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma) 0,06% em PBS por 10 minutos, mexendo constantemente. Em seguida, foi preparada uma solução de  $H_2O_2$  10% diluído em água, sendo aplicada à solução de DAB na proporção de 1  $\mu$ L  $H_2O_2$  10% para 1000  $\mu$ L da solução DAB. Os cortes ficaram incubando por mais 10 minutos até o aparecimento de um precipitado de cor parda.

Depois da revelação, os cortes foram lavados em PBS por 5 vezes, 1 minuto cada lavagem, e lavados 1 vez em água destilada.



Para finalizar o processo as lâminas foram desidratadas em série alcoólica crescente (95 e 100%) duas vezes, diafanizadas em xilol por 2 vezes. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá e lamínulas. A observação foi realizada em microscópio óptico (NIKON Eclipse E600). Após a observação, alguns cortes foram selecionados e fotografados com o auxílio de uma câmara digital (SONY DSC-W1) acoplada ao microscópio.

### **3.7. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média ( $\pm$ ) erro padrão da média (EPM). Foram utilizados teste t para amostras independentes e análise de variância (ANOVA) de uma, duas ou três vias, conforme o objetivo do experimento, seguida do pós-teste 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  $P < 0,05$ . As curvas de competição de serotonina, metiotepina e cirpoeptadina dos experimentos *in vitro* foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudos “*in vivo*”

#### 4.1.1. Efeitos da injeção de serotonina e dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre o metabolismo de carboidratos e a postura

Os efeitos da injeção de serotonina e dos antagonistas dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>, sobre os valores glicêmicos medidos na hemolinfa de caranguejos alimentados com dieta RC ou RP, podem ser vistos na Figura 5. Houve diferença significativa entre as dietas ( $p < 0,05$ ) e entre os tempos em ambas as dietas.

Nos animais da dieta RP (Figura 5A) observou-se um aumento de 1,7 vezes ( $p < 0,05$ ) nos valores glicêmicos no grupo 5-HT aos 60 minutos, e de 6,9 e 4,8 vezes aos 60 e 120 minutos, respectivamente, no grupo metiotepina em relação ao tempo zero. O grupo metiotepina teve aos 60 minutos, seu valor glicêmico significativamente ( $p < 0,05$ ) elevado em relação a todos os outros grupos. A ciproeptadina não causou alterações significativas nos valores glicêmicos.

Nos animais da dieta RC (Figura 5B) observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores glicêmicos de 2,9 vezes aos 60 minutos e 4,9 vezes aos 120 minutos, no grupo 5-HT, 4 vezes aos 60 minutos e 4,5 vezes aos 120 minutos, no grupo metiotepina e 2,2 vezes aos 60 minutos e 3,1 vezes aos 120 minutos, no grupo ciproeptadina em relação ao tempo zero.

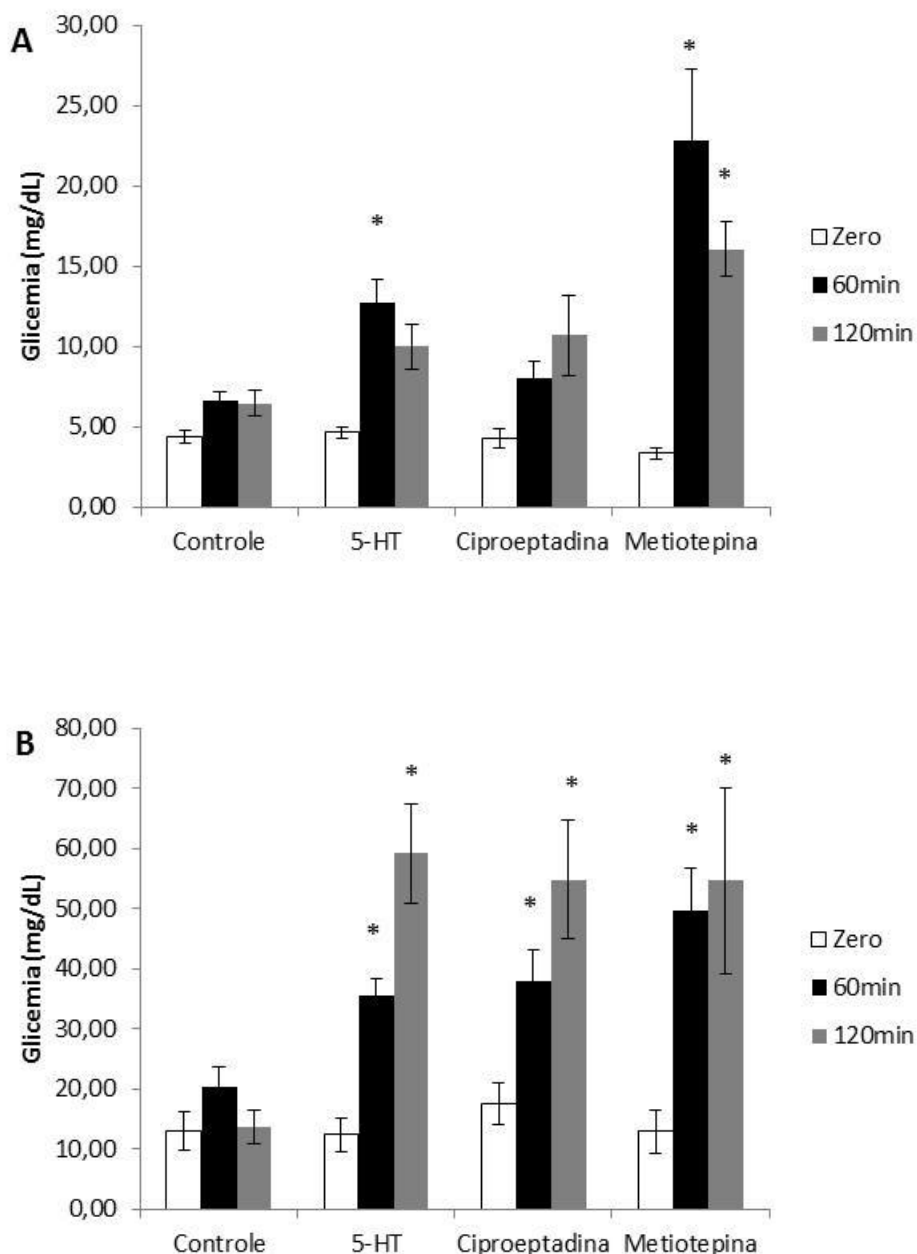


Figura 5- Efeitos da injeção de serotonina, ciproptadina e metiotepina sobre a glicemia, em caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), no tempo zero e após 60 ou 120 minutos. A) Controle (n=38/19/14) 5-HT (n=42/20/19) ciproptadina (n=31/15/12) metiotepina (n=16/7/8). B) Controle (n=33/18/15) 5-HT (n=36/18/18) ciproptadina (n=27/13/13) metiotepina (n=15/7/7). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM. \* diferença significativa em relação ao tempo zero.

A concentração de glicogênio das amostras de tecidos foi determinada pela concentração de glicose liberada, e os resultados da concentração de glicogênio

nas brânquias anteriores e posteriores de ambas as dietas estão representadas nas Figuras 6 e 7.

Nas brânquias anteriores dos animais alimentados com dieta RP (Figura 6A), houve uma diminuição significativa de 32% ( $p < 0,05$ ) nos valores de glicogênio aos 60 minutos, no grupo metiotepina, em relação ao grupo controle. Nas brânquias anteriores dos animais alimentados com dieta RC (Figura 6B), não ocorreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

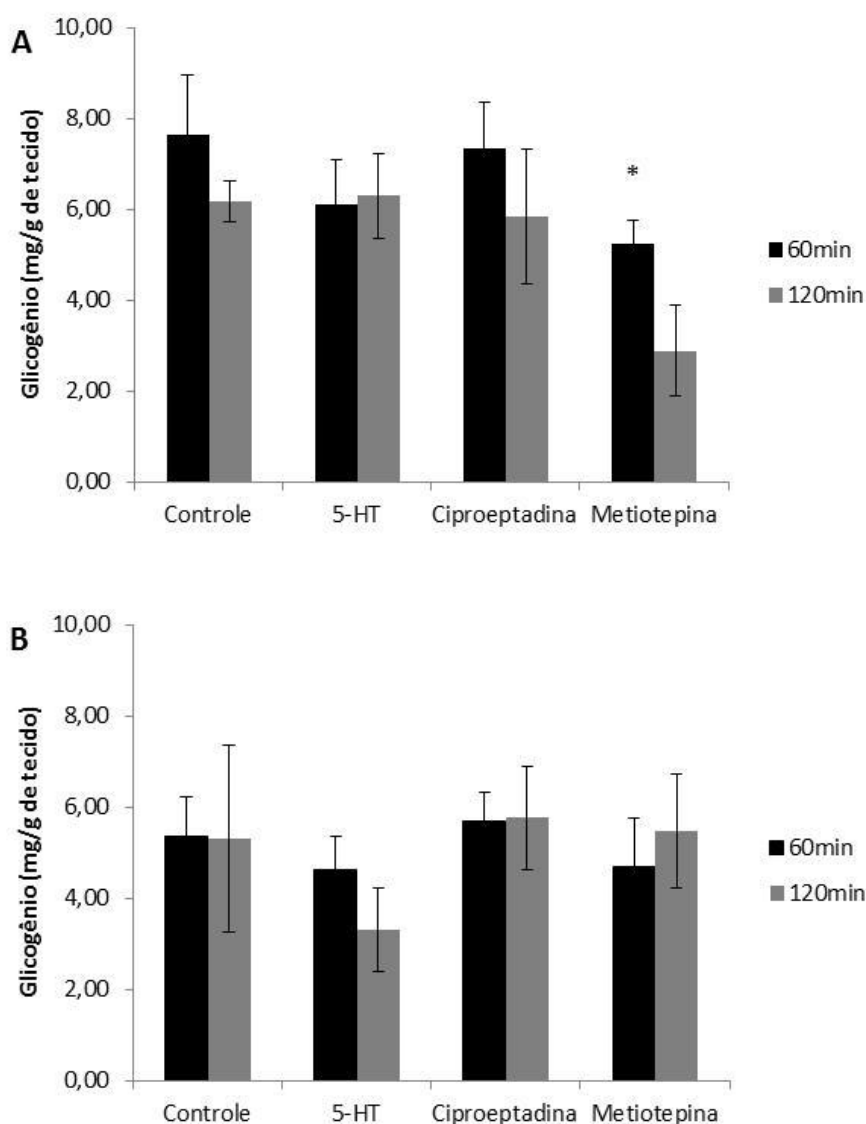


Figura 6- Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio em brânquias anteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos. A) Controle (n=4/4) 5-HT (n=6/7) ciproeptadina (n=6/6) metiotepina

(n=6/6). B) Controle (n=4/4) 5-HT (n=6/7) ciproeptadina (n=6/6) metiotepina (n=6/6). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM. \* diferença significativa em relação ao grupo controle.

Nas brânquias posteriores dos animais alimentados com dieta RP (Figura 7A) e dieta RC (Figura 7B), não ocorreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo controle.

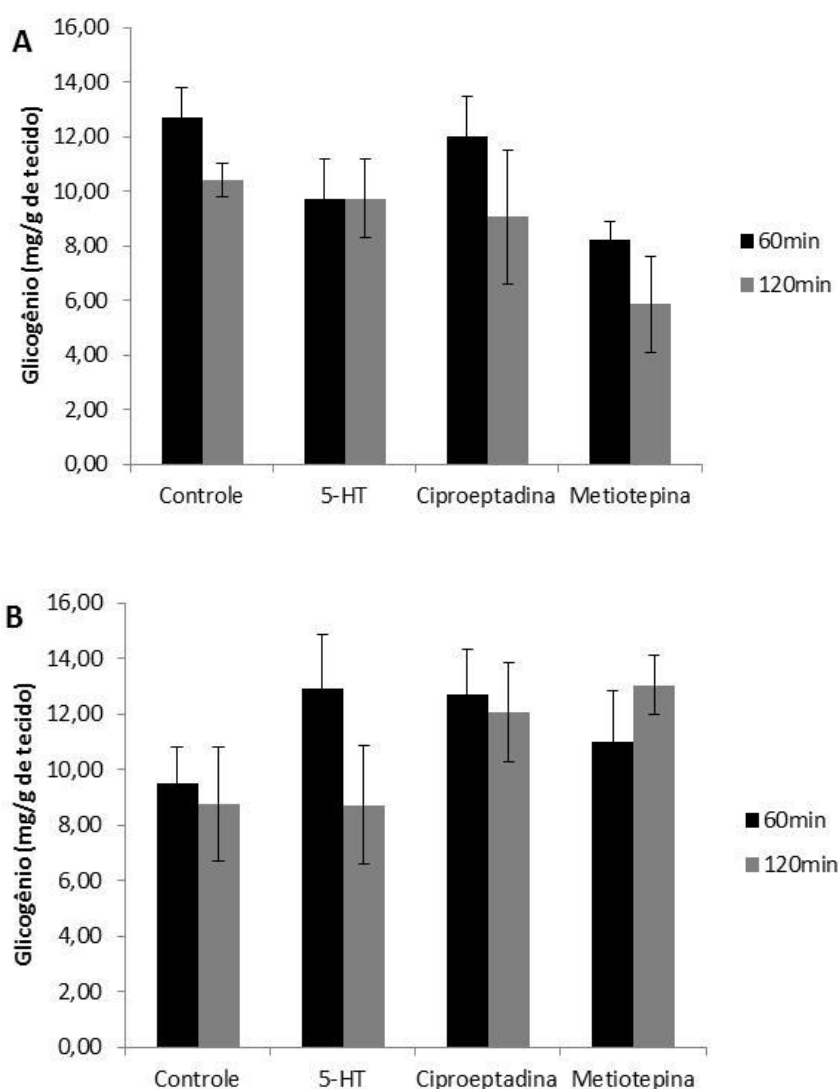


Figura 7- Efeitos da injeção de serotonina, ciproeptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio em brânquias posteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos. a) Controle (n=4-4) 5-HT (n=6-7) ciproeptadina (n=6-5) metiotepina (n=6-6). b) Controle (n=4-4) 5-HT (n=6-7) ciproeptadina (n=6-6) metiotepina (n=6-6). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM.

A concentração de glicogênio no músculo mandibular está representada na Figura 8. Não ocorreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ), nos tempos de 60 e 120 minutos, em relação ao grupo controle, nos animais alimentados com ambas as dietas.

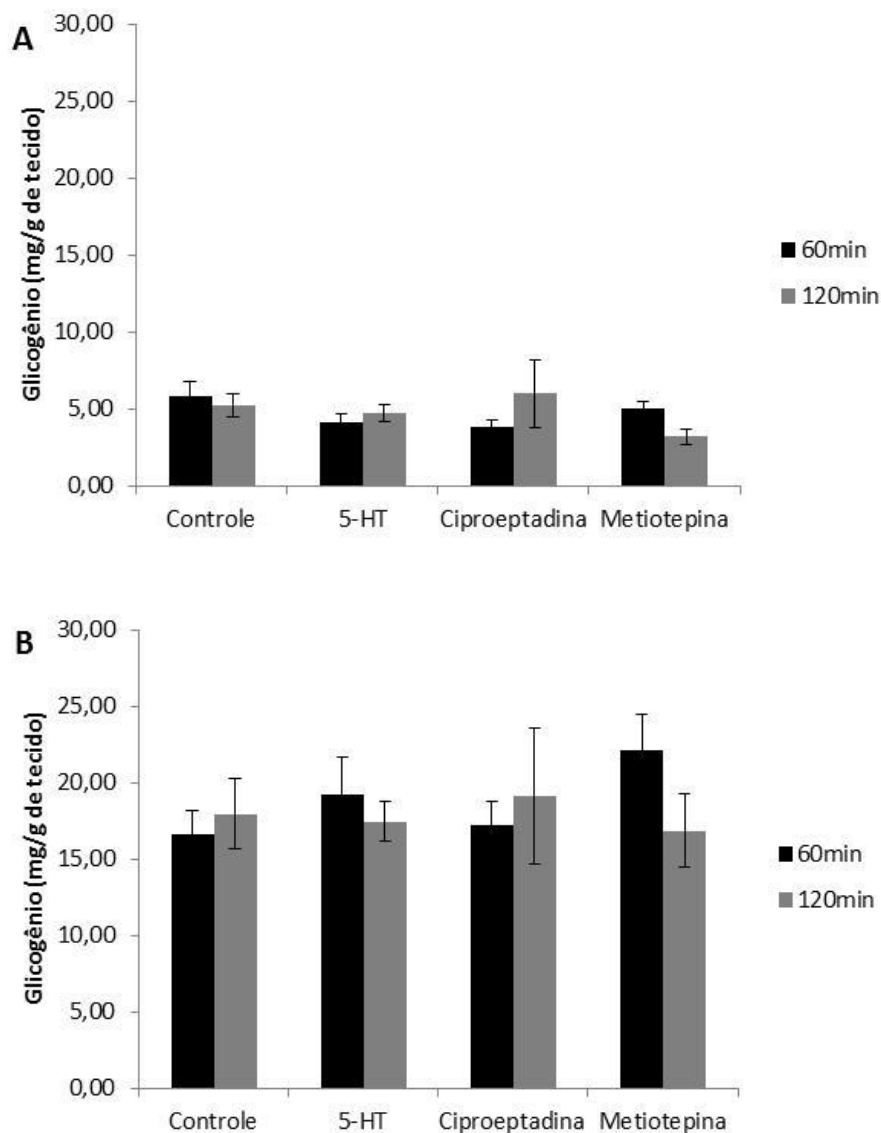


Figura 8- Efeitos da injeção de serotonina, ciproheptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio no músculo mandibular de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos. a) Controle (n=18-16) 5-HT (n=20-18) ciproheptadina (n=15-11) metiotepina (n=7-9). b) Controle (n=17-14) 5-HT (n=18-15) ciproheptadina (n=12-13) metiotepina (n=8-8). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM.

A Figura 9 representa os valores da concentração de glicogênio no hepatopâncreas dos animais alimentados com dieta RP (Figura 9A) e RC (Figura 9B). Igualmente ao músculo, no hepatopâncreas não ocorreram alterações significativas ( $p>0,05$ ) nos tempos de 60 e 120 minutos, em relação ao grupo controle, nos animais alimentados com ambas as dietas.

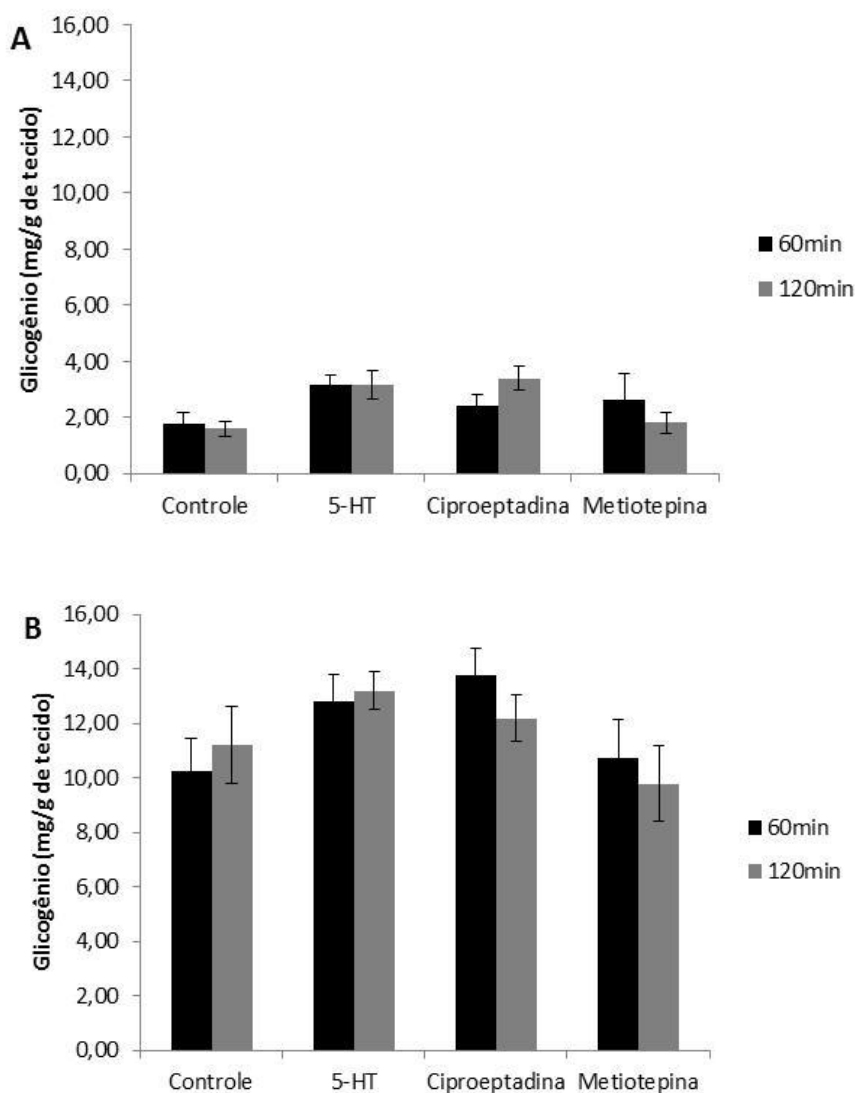


Figura 9- Efeitos da injeção de serotonina, ciproheptadina e metiotepina sobre a concentração de glicogênio no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), após o tempo de 60 ou 120 minutos. a) Controle (n=19-16) 5-HT (n=20-18) ciproheptadina (n=14-12) metiotepina (n=7-9). b) Controle (n= 18-15) 5-HT (n=17-15) ciproheptadina (n=13-12) metiotepina (n=8-8). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM.

A postura dos animais após injeção de 5-HT e do antagonista metiotepina está representada na Figura 10. Nos animais tratados com solução salina (Figura 10A) não foi observada mudança postural, permanecendo igual antes e depois da injeção, diferentemente dos animais tratados com 5-HT (Figura 10B), que apresentam uma flexão de membros e abdome e dos tratados com metiotepina (Figura 10C), antagonista de receptores 5-HT<sub>1</sub>, promovendo um relaxamento da musculatura. Nos animais tratados com metiotepina seguida de 5-HT (Figura 10D) observa-se uma postura intermediária entre os tratados com 5-HT e metiotepina. A ciproptadina não causou alterações posturais.

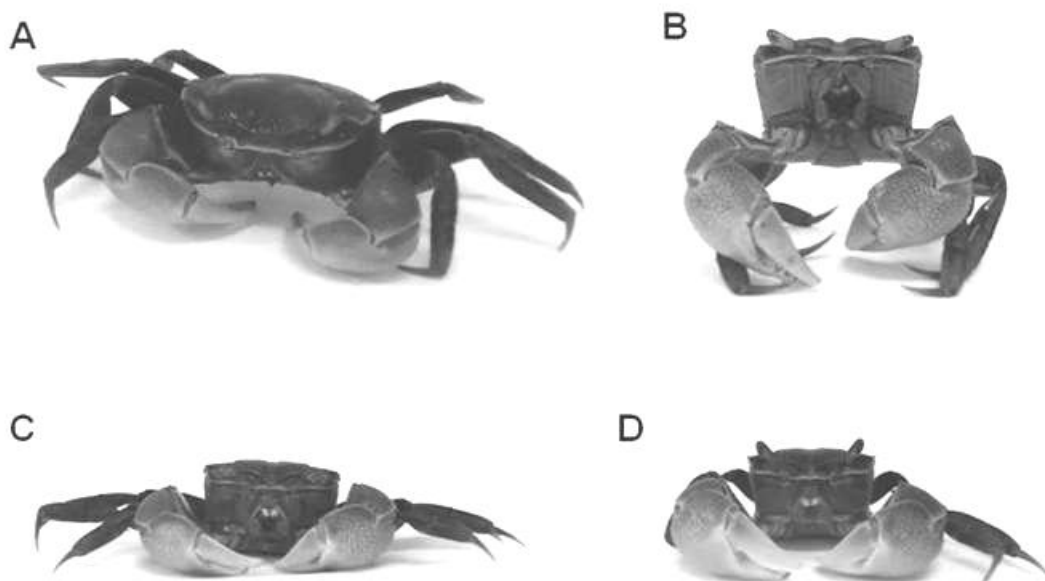


Figura 10- Efeitos da injeção de serotonina e do antagonista metiotepina sobre a postura no caranguejo *N. granulata*. A) animal controle tratado com solução salina; B) animal tratado com serotonina mostrando flexão de membros e abdome; C) animal tratado com metiotepina mostrando relaxamento da musculatura; D) animal tratado com metiotepina seguida de serotonina mostrando uma postura intermediária.



#### **4.1.2 Curva de tempo para ligação de serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>) em tecidos-alvo periféricos**

Na Figura 11 estão representadas as curvas de tempo para ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores, brânquias posteriores, coração, hepatopâncreas e músculo mandibular do caranguejo *N. granulata* alimentados com ambas as dietas. Houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas em todos os tecidos e entre os tempos nas brânquias anteriores e posteriores.

Nos animais alimentados com dieta RP (Figura 11A) observou-se uma diminuição da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de 34% aos 30 minutos e de 67% aos 60 minutos, nas brânquias anteriores. Nas brânquias posteriores a redução foi de 37% aos 30 minutos e de 61% aos 60 minutos, com relação ao tempo 15 minutos. Nos animais alimentados com dieta RC (Figura 11B), observou-se aos 60 minutos, uma diminuição na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de 62% e 47%, respectivamente, nas brânquias anteriores e posteriores, com relação ao tempo de 15 minutos.

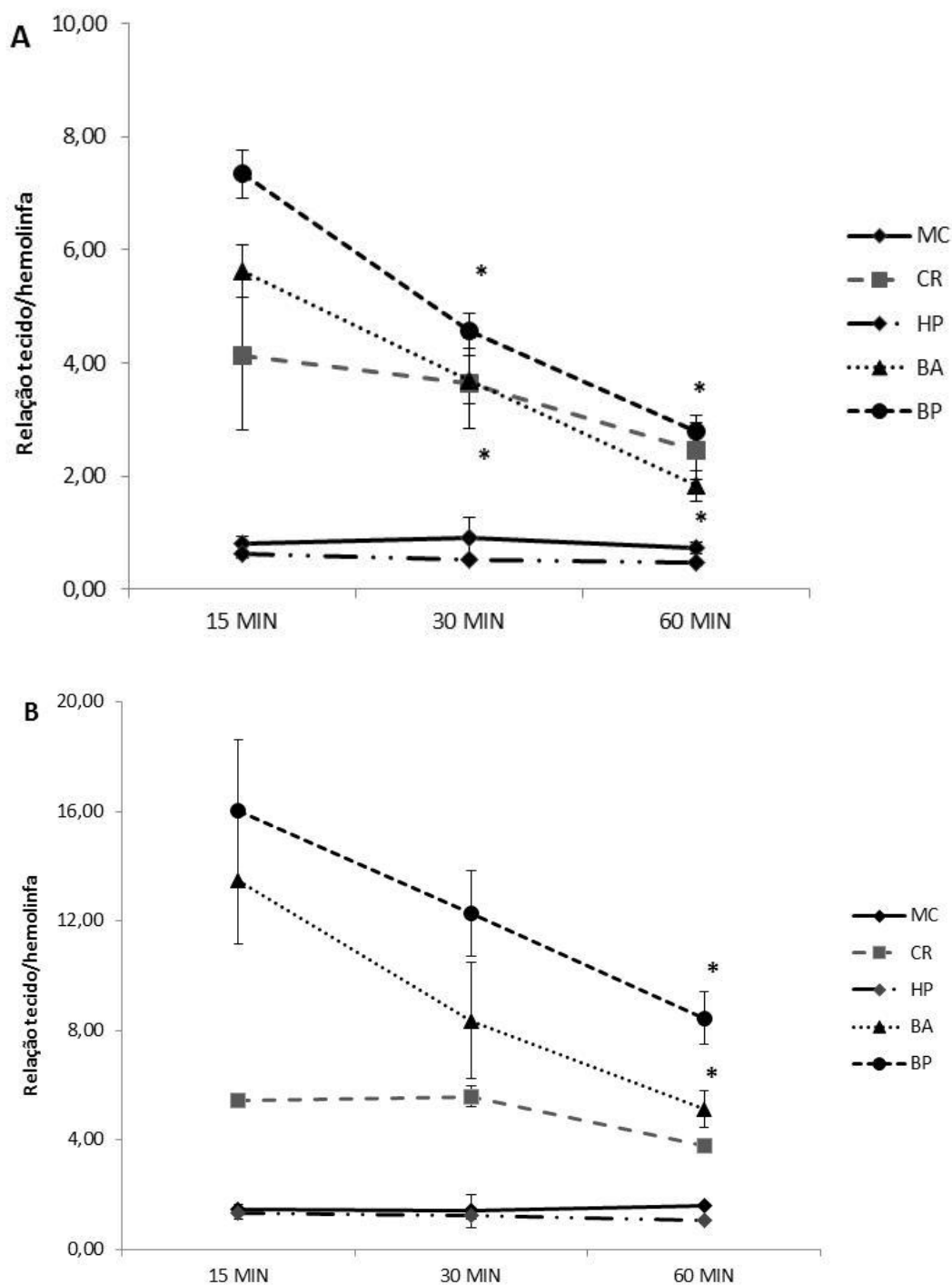


Figura 11 - Ligação de serotonina triciada ( $5\text{-HT-H}^3$ ) (dpm/g de tecido/100 $\mu\text{L}$  de hemolinfa) nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), hepatopâncreas (HP), brânquias anteriores (BA) e brânquias posteriores (BP), de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B) nos tempos de 15 (n=5), 30 (n=5) e 60 (n=6) minutos. As linhas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  EPM. \* diferença significativa em relação ao tempo 15 minutos.

Através da análise destes resultados, pode-se observar também que coração, brânquias anteriores e posteriores são os tecidos com maior ligação para 5-HT-H<sup>3</sup>.

#### **4.1.3. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos**

Os resultados da ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores, brânquias posteriores, coração, hepatopâncreas e músculo mandibular do caranguejo, estão demonstrados na Figura 12.

Houve diferença significativa entre as dietas em todos os tecidos e entre os tratamentos com serotonina e dopamina nas brânquias anteriores, brânquias posteriores, hepatopâncreas e músculo mandibular.

Nos animais alimentados com dieta RP (Figura 12A), houve uma diminuição ( $p < 0,05$ ) da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de 41% nas brânquias posteriores, no grupo serotonina em relação ao grupo SFCT. Nas brânquias anteriores, houve uma diminuição significativa da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de 64% e 33%, respectivamente, nos grupos tratados com serotonina e dopamina em relação ao grupo SFCT. No hepatopâncreas, houve um aumento significativo de 42% na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no grupo dopamina em relação ao grupo controle. No músculo mandibular, houve uma diminuição significativa de 57% da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no grupo serotonina em relação ao grupo dopamina.

Não ocorreram alterações significativas ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos nos tecidos dos animais alimentados com dieta RC (Figura 12B).

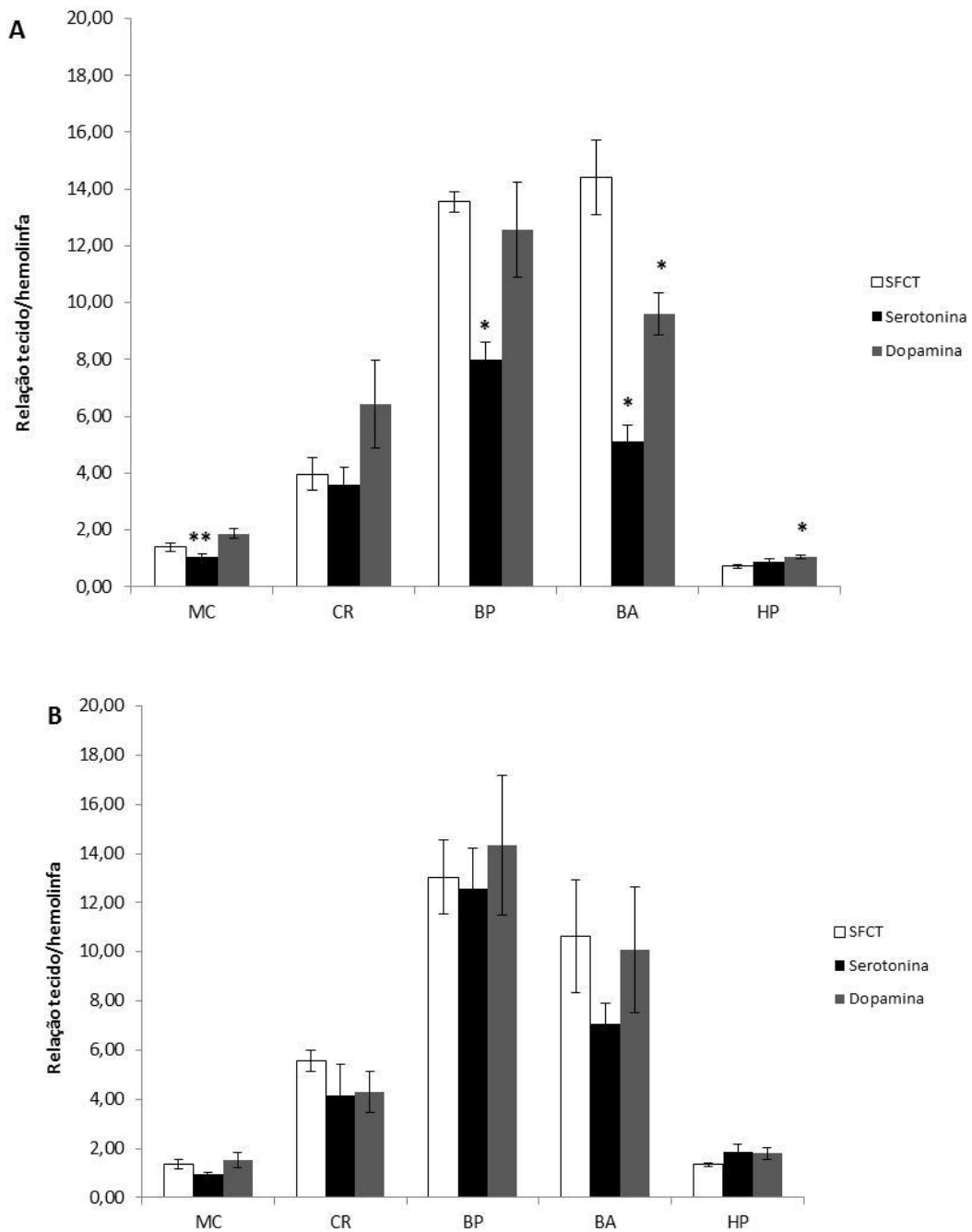


Figura 12 - Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> (dpm/g de tecido/100µL de hemolinfa) nos grupos SFCT (200.000 dpm/100µL SFC) (n=5), serotonina (5,69x10<sup>-3</sup> moles/caranguejo + 200.000 dpm/100µL SFC) (n=5) e dopamina (5,3x10<sup>-3</sup> + 200.000 dpm/100µL SFC) (n=5) nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), brânquias posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e hepatopâncreas (HP) de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± EPM. \* diferença significativa em relação ao grupo SFCT. \*\* diferença significativa em relação ao grupo dopamina.

#### **4.1.4. Efeito dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>**

Na Figura 13 estão representados os efeitos dos antagonistas sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no músculo mandibular, coração, hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores do caranguejo, alimentados com ambas as dietas. Houve diferença significativa entre as dietas e entre os tratamentos com metiotepina e ciproeptadina em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo mandibular.

Na Figura 13A, que representa graficamente os tecidos dos animais alimentados com dieta RP, observou-se um aumento da ligação ( $p < 0,05$ ) de 5-HT-H<sup>3</sup>, de 82% e 130%, respectivamente, nas brânquias anteriores e posteriores, no grupo metiotepina em relação ao grupo SFCT. Observou-se também, uma diminuição da ligação ( $p < 0,05$ ) no grupo ciproeptadina de 55% e 46%, respectivamente, nas brânquias posteriores e hepatopâncreas em relação ao grupo metiotepina.

Nos animais alimentados com dieta RC, representados na Figura 13B, observou-se no músculo mandibular, uma diminuição significativa de 40% da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no grupo metiotepina em relação ao grupo SFCT.

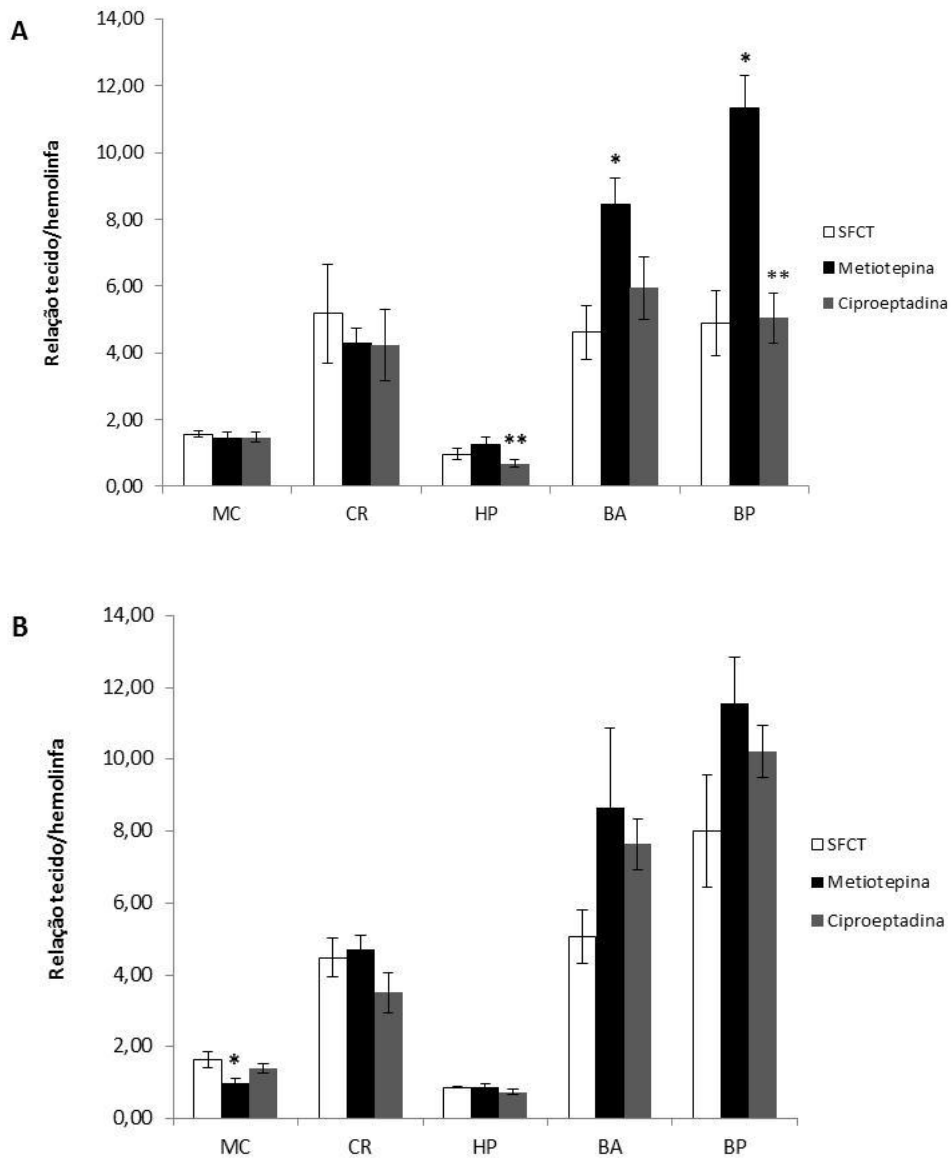


Figura 13 – Efeitos do uso de antagonistas sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> (dpm/g de tecido/100µL de hemolinfa) nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), hepatopâncreas (HP), brânquias anteriores (BA) e brânquias posteriores (BP), de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B), com os grupos SFCT (200.000 dpm/100µL SFC) (n=4), metiotepina (2,21x10<sup>-2</sup> moles/caranguejo + 200.000 dpm/100µL SFC) (n=8) e ciproeptadina (x10<sup>-3</sup> moles/caranguejo + 200.000 dpm/100µL SFC) (n=8). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± EPM. \* diferença significativa em relação ao grupo SFCT. \*\* diferença significativa em relação ao grupo metiotepina.

#### 4.1.5. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo sem aclimação e dieta

Na Figura 14 está representada a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nos tecidos periféricos do caranguejo *N. granulata*, sem período de aclimação e dieta. Houve diferença significativa entre os grupos no músculo mandibular, coração e hepatopâncreas. Observou-se uma diminuição ( $p < 0,05$ ) de 58% da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no músculo mandibular, 41% no hepatopâncreas e 22% no coração no grupo serotonina em relação ao grupo SFCT.

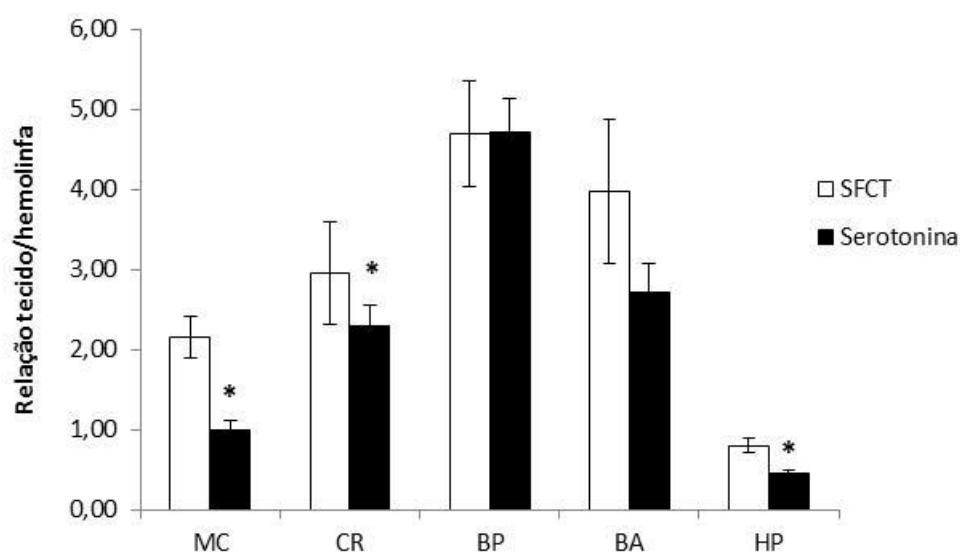


Figura 14- Ligação de serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>) (dpm/g de tecido/100µL de hemolinfa) nos tecidos-alvo periféricos: músculo mandibular (MC), coração (CR), brânquias posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e hepatopâncreas (HP), de caranguejos sem aclimação e dieta, nos grupos SFCT (200.000 dpm/100µL SFC) (n=7) e serotonina (5,69x10<sup>-3</sup> moles/caranguejo + 200.000 dpm/100µL SFC) (n=7). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± EPM. \* diferença significativa em relação ao grupo SFCT.

## 4.2 Estudos “*in vitro*”

### 4.2.1. Curva de tempo para 5-HT fria e antagonistas nas brânquias anteriores e posteriores

A Figura 15 representa a curva de tempo de ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores de animais alimentados com dieta RP (Figura 15A) ou RC (Figura 15B), utilizando serotonina e os antagonistas metiotepina e ciproeptadina. O teste de ANOVA de duas vias dos dados (dpm/g de tecido) identificou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as dietas e entre os grupos controle, serotonina e ciproeptadina. Observa-se com o uso de serotonina e do antagonista ciproeptadina uma diminuição na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em relação ao grupo controle nos animais alimentados com dieta RP e RC, mas não ocorreram alterações significativas da ligação ao longo dos tempos 5, 15 e 30 minutos em nenhum dos tratamentos utilizados em ambas as dietas.



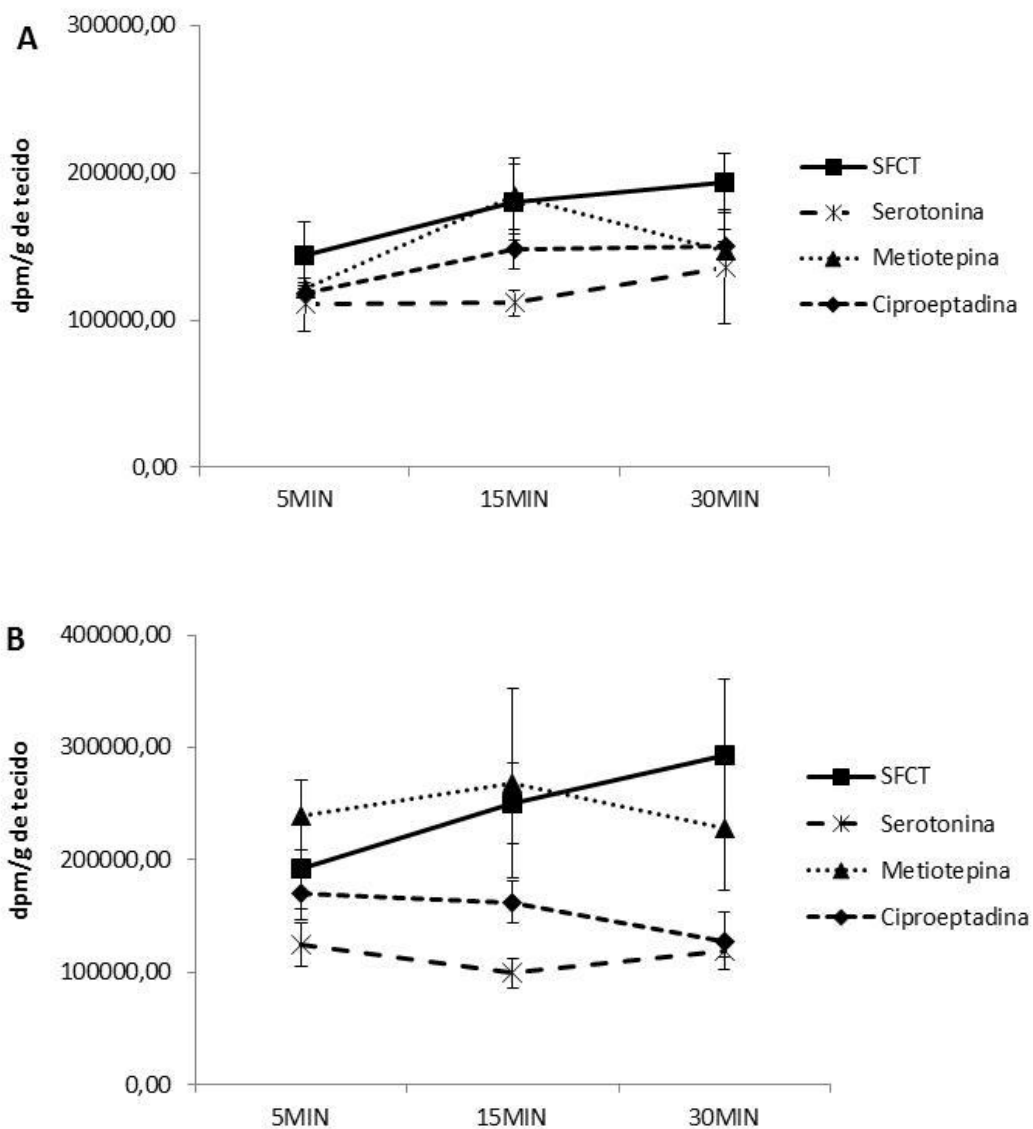


Figura 15 – Curva de tempo de ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> (dpm/g de tecido), em brânquias anteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) e rica em carboidratos (B) após o tratamento com serotonina, metiotepina ou ciproeptadina. Tempos: 5 (n=14/14), 15 (n=20/20) e 30 (n=12/12) minutos. Grupos SFCT (200.000dpm/100µLSFC), serotonina (10<sup>-4</sup>M em SFCT), metiotepina (10<sup>-4</sup>M em SFCT) e ciproeptadina (10<sup>-4</sup>M em SFCT). As linhas e as barras representam, respectivamente, as médias ± EPM.

Os resultados da curva de tempo nas brânquias posteriores estão representados na Figura 16. Houve diferença significativa (p<0,05) entre as dietas, entre os grupos SFCT, serotonina e ciproeptadina e entre os tempos em ambas as dietas.

Nos animais alimentados com dieta RP (Figura 16A), observa-se que o uso de serotonina e do antagonista ciproeptadina diminuiu a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em relação ao grupo SFCT e houve alteração significativa da ligação no tempo 30 minutos em relação ao 5 minutos, no grupo serotonina.

Nos animais alimentados com dieta RC (Figura 16B), igualmente à dieta RP, observa-se que o uso de serotonina e do antagonista ciproeptadina diminuiu a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em relação ao grupo SFCT. Ocorreram alterações significativas da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> no tempo 30 minutos em relação ao 5 minutos, no grupo SFCT, e do tempo 30 minutos com relação aos tempos 15 e 5 minutos, no grupo serotonina.

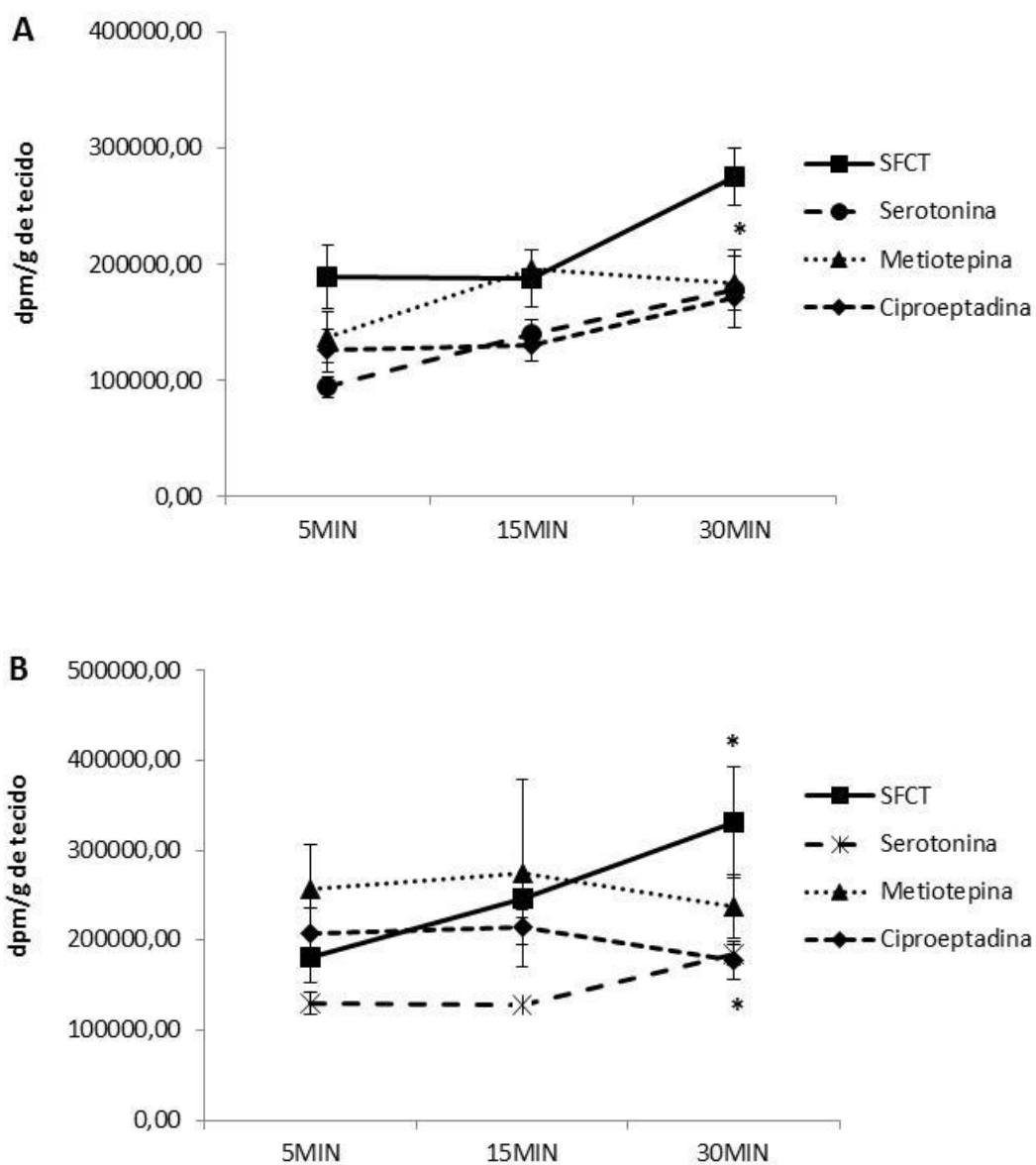


Figura 16 – Curva de tempo de ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> (dpm/g de tecido), em brânquias posteriores de caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (A) e rica em carboidratos (B) após o tratamento com serotonina, metiotepina ou ciproeptadina. Tempos: 5 (n=14/14), 15 (n=20/20) e 30 (n=12/12) minutos. Grupos SFCT (200.000dpm/100µL SFC), serotonina (10<sup>-4</sup>M e SFCT), metiotepina (10<sup>-4</sup>M e SFCT), e ciproeptadina (10<sup>-4</sup>M e SFCT). As linhas e as barras representam, respectivamente, as médias ± EPM.\* diferença significativa em relação ao tempo 5 minutos.

#### 4.2.2. Ligação específica de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores

As curvas de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> e serotonina nas brânquias anteriores de caranguejos alimentados com dieta RP ou RC, podem ser observadas na Figura 17. Os resultados obtidos em dpm/g de tecido foram analisados por ANOVA em duas vias e foram identificadas diferenças significativas entre as dietas e entre os tratamentos. Na figura, os resultados estão expressos em % de ligação em relação ao grupo incubado apenas com 5-HT-H<sup>3</sup> (SFTC). As curvas foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson e as correlações foram consideradas significativas ( $p < 0,01$ ). Observa-se que a administração de serotonina em doses crescentes reduz a porcentagem de ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. Esta redução atinge 65% nos animais alimentados com dieta RP e 45% nos animais da dieta RC.

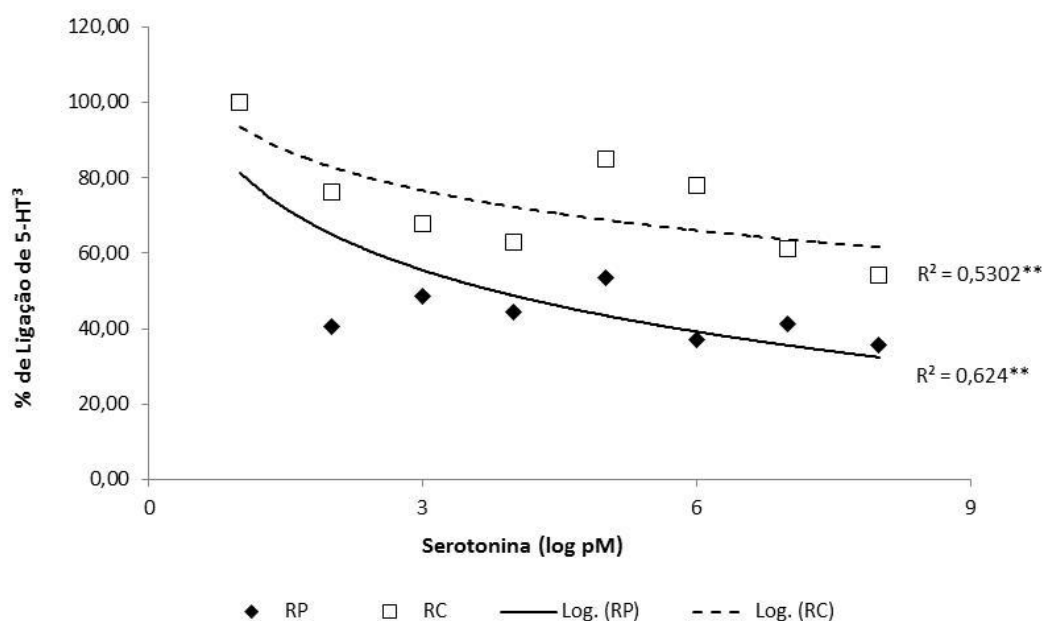


Figura 17 – Curva de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> (SFTC) e serotonina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC). Grupos: SFTC (n=7), doses de serotonina: 10<sup>-12</sup>M (n=4), 10<sup>-11</sup>M (n=4), 10<sup>-10</sup>M (n=4), 10<sup>-9</sup>M (n=4), 10<sup>-8</sup>M (n=4) 10<sup>-7</sup>M (n=7) e 10<sup>-6</sup>M (n=4). \*\* Correlação significativa pelo teste de Pearson,  $p < 0,01$ . Dados expressos como % de ligação em relação ao grupo SFTC.

A curva de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> e serotonina nas brânquias posteriores de caranguejos alimentados com dieta RP ou RC, podem ser observadas na Figura 18. Os resultados obtidos em dpm/g de tecido foram analisados por ANOVA de duas vias que identificou diferença significativa entre as dietas. Na Figura 18, os resultados estão expressos em % de ligação em relação ao grupo incubado apenas com 5-HT-H<sup>3</sup> (SFTC). As curvas foram analisadas pelo teste de correlação de Pearson e as correlações foram consideradas significativas (p<0,01). Observa-se que a administração de serotonina em doses crescentes reduz a porcentagem de ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. Esta redução atinge 69,07% nos animais alimentados com dieta RP e 43,26% nos animais da dieta RC.

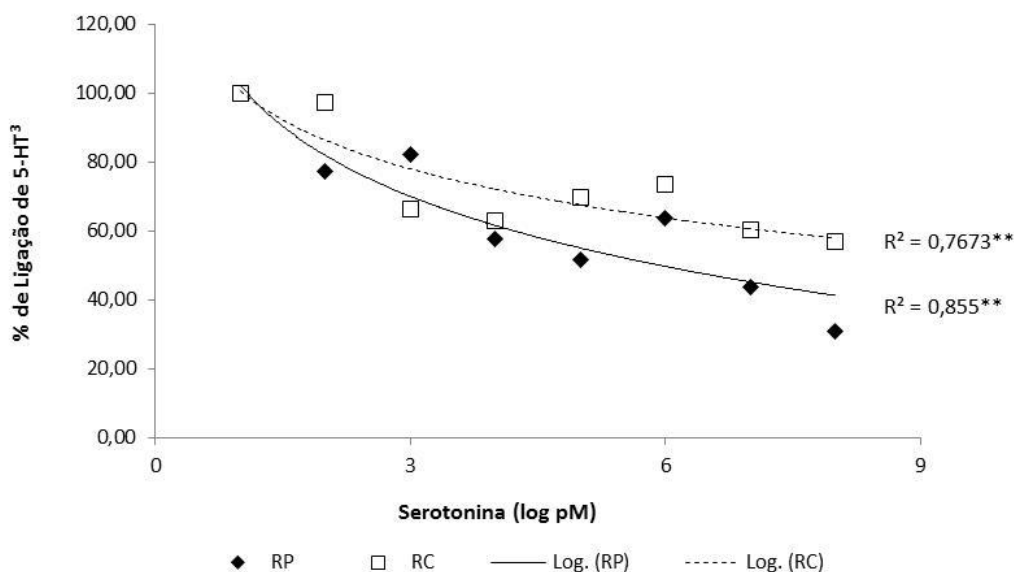


Figura 18– Curva de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> (SFTC) e serotonina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC). Dieta RP: SFTC (n=7), doses de serotonina: 10<sup>-12</sup>M (n=4), 10<sup>-11</sup>M (n=4), 10<sup>-10</sup>M (n=4), 10<sup>-9</sup>M (n=4), 10<sup>-8</sup>M (n=4) 10<sup>-7</sup>M (n=7) e 10<sup>-6</sup>M (n=4). Dieta RC: SFTC (n=7), doses de serotonina: 10<sup>-12</sup>M (n=4), 10<sup>-11</sup>M (n=4), 10<sup>-10</sup>M (n=4), 10<sup>-9</sup>M (n=4), 10<sup>-8</sup>M (n=4) 10<sup>-7</sup>M (n=7) e 10<sup>-6</sup>M (n=4). \*\* Correlação significativa pelo teste de Pearson, p<0,01. Dados expressos como % de ligação em relação ao grupo SFTC.

### 4.2.3 Efeito da metiotepina sobre a ligação 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores

Os resultados mostrados nas Figuras 19 e 20 representam as curvas de competição entre o antagonista metiotepina e a 5-HT-H<sup>3</sup>, em brânquias anteriores e posteriores de animais alimentados com ambas as dietas. Os resultados obtidos em dpm/g de tecido foram analisados por ANOVA de uma via e não ocorreram alterações significativas. Nas figuras, os resultados estão expressos em % de ligação em relação ao grupo incubado apenas com 5-HT-H<sup>3</sup> (SFTC). As correlações não foram significativas pelo teste de Pearson.

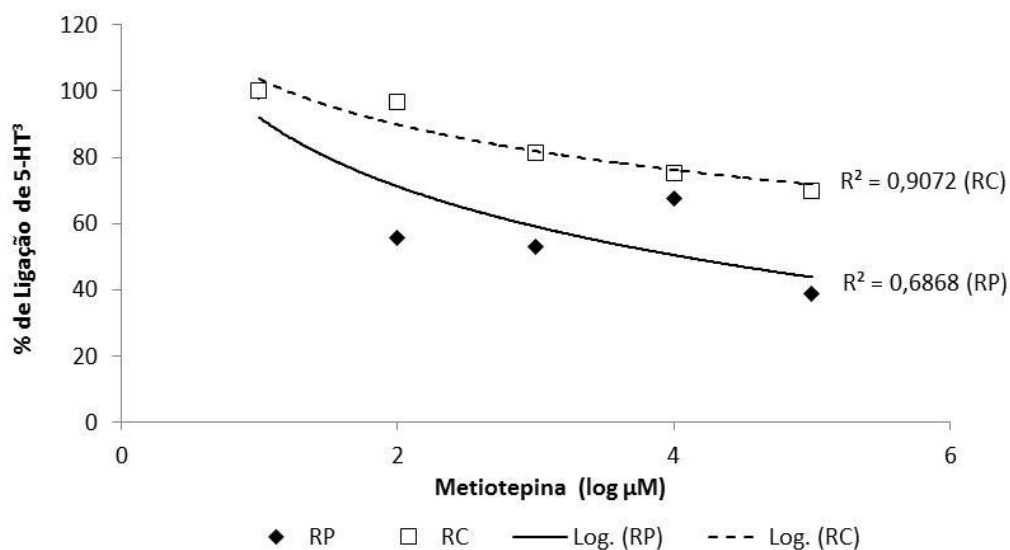


Figura 19 - Curva de competição de metiotepina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). SFTC (n=7), Metiotepina 10<sup>-7</sup>M (n=7), 10<sup>-6</sup>M (n=2), 10<sup>-5</sup>M (n=3), 10<sup>-4</sup>M (n=3). Dados expressos como % de ligação em relação ao grupo SFTC.

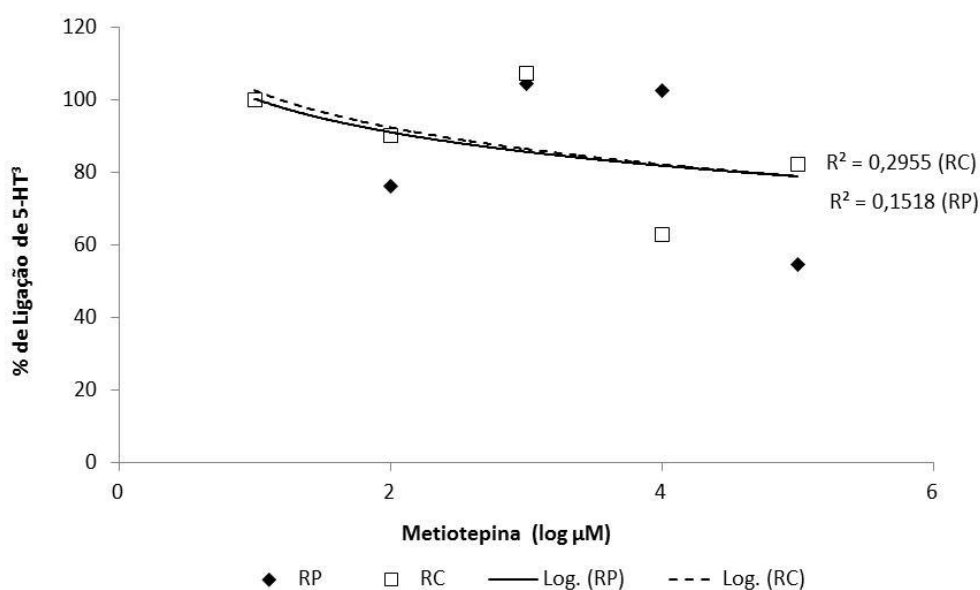


Figura 20 - Curva de competição de metiotepina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). Dieta RP: SFCT (n=6), Metiotepina  $10^{-7}$ M (n=7),  $10^{-6}$ M (n=3),  $10^{-5}$ M (n=2),  $10^{-4}$ M (n=3). Dieta RC: SFCT (n=7), Metiotepina  $10^{-7}$ M (n=7),  $10^{-6}$ M (n=3),  $10^{-5}$ M (n=3),  $10^{-4}$ M (n=3). Dados expressos como % de ligação em relação ao grupo SFCT.

#### 4.2.4 Efeito da ciproptadina sobre a ligação 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores

Os resultados mostrados nas Figuras 21 e 22 representam as curvas de competição do antagonista ciproptadina, administrado em brânquias anteriores e posteriores, de animais alimentados com ambas as dietas. Os resultados obtidos em dpm/g de tecido de cada dieta foram analisados por ANOVA de uma via e não ocorreram alterações significativas. Nas Figuras 21 e 22, os resultados estão expressos em % de ligação em relação ao grupo incubado apenas com 5-HT-H<sup>3</sup> (SFCT). As correlações não foram significativas pelo teste de Pearson.

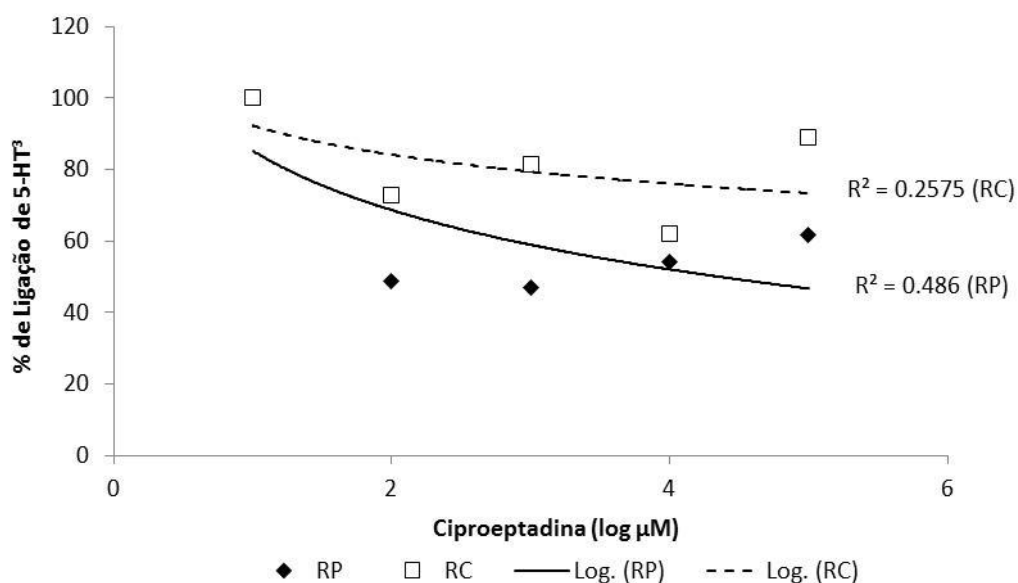


Figura 21 - Curvas de competição de ciproeptadina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). Dieta RP: SFCT (n=7), Ciproeptadina  $10^{-7}$ M (n=3),  $10^{-6}$ M (n=3),  $10^{-5}$ M (n=3),  $10^{-4}$ M (n=7). Dieta RC: SFCT (n=7), Ciproeptadina  $10^{-7}$ M (n=3),  $10^{-6}$ M (n=3),  $10^{-5}$ M (n=3),  $10^{-4}$ M (n=6). Dados expressos como % de ligação em relação ao grupo SFTC.

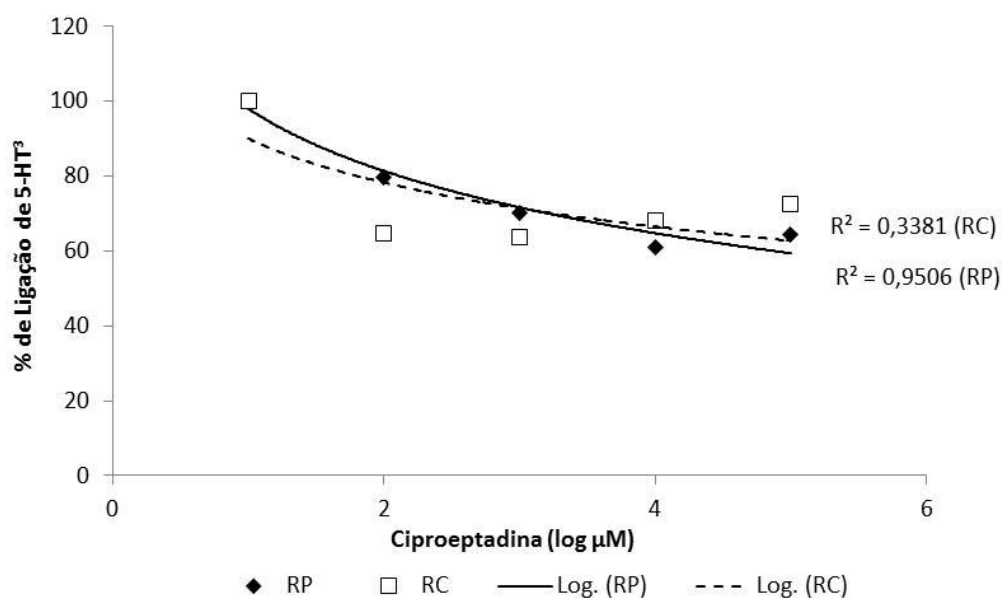


Figura 22 - Curvas de competição de ciproeptadina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). Dieta RP: SFCT (n=3), Ciproeptadina  $10^{-7}$ M (n=3),  $10^{-6}$ M (n=3),  $10^{-5}$ M (n=3),  $10^{-4}$ M (n=3). Dieta RC: SFCT (n=3), Ciproeptadina  $10^{-7}$ M (n=3),  $10^{-6}$ M (n=2),  $10^{-5}$ M (n=3),  $10^{-4}$ M (n=3). Dados expressos como % de ligação em relação ao grupo SFTC.



#### 4.2.5 Comparação entre os efeitos da serotonina e dos antagonistas sobre a ligação 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e posteriores

Os resultados mostrados na Figura 23 representam as curvas de competição de serotonina e dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina em brânquias anteriores para fins de comparação.

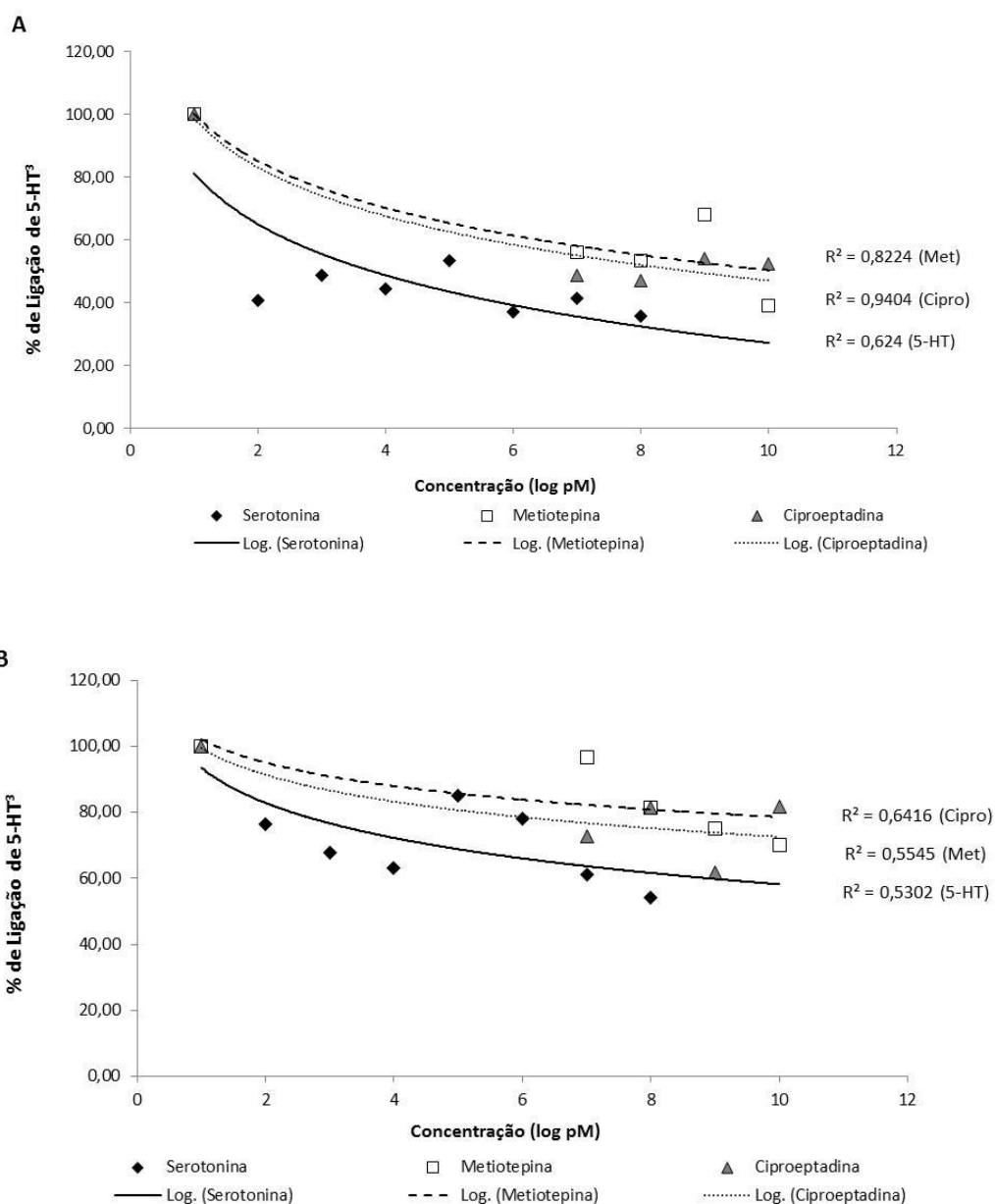


Figura 23 - Curvas de competição de serotonina, metiotepina e ciproeptadina em brânquias anteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B).

Os resultados mostrados na Figura 24 representam as curvas de competição de serotonina e dos antagonistas metiotepina e ciproeptadina em brânquias posteriores para fins de comparação.

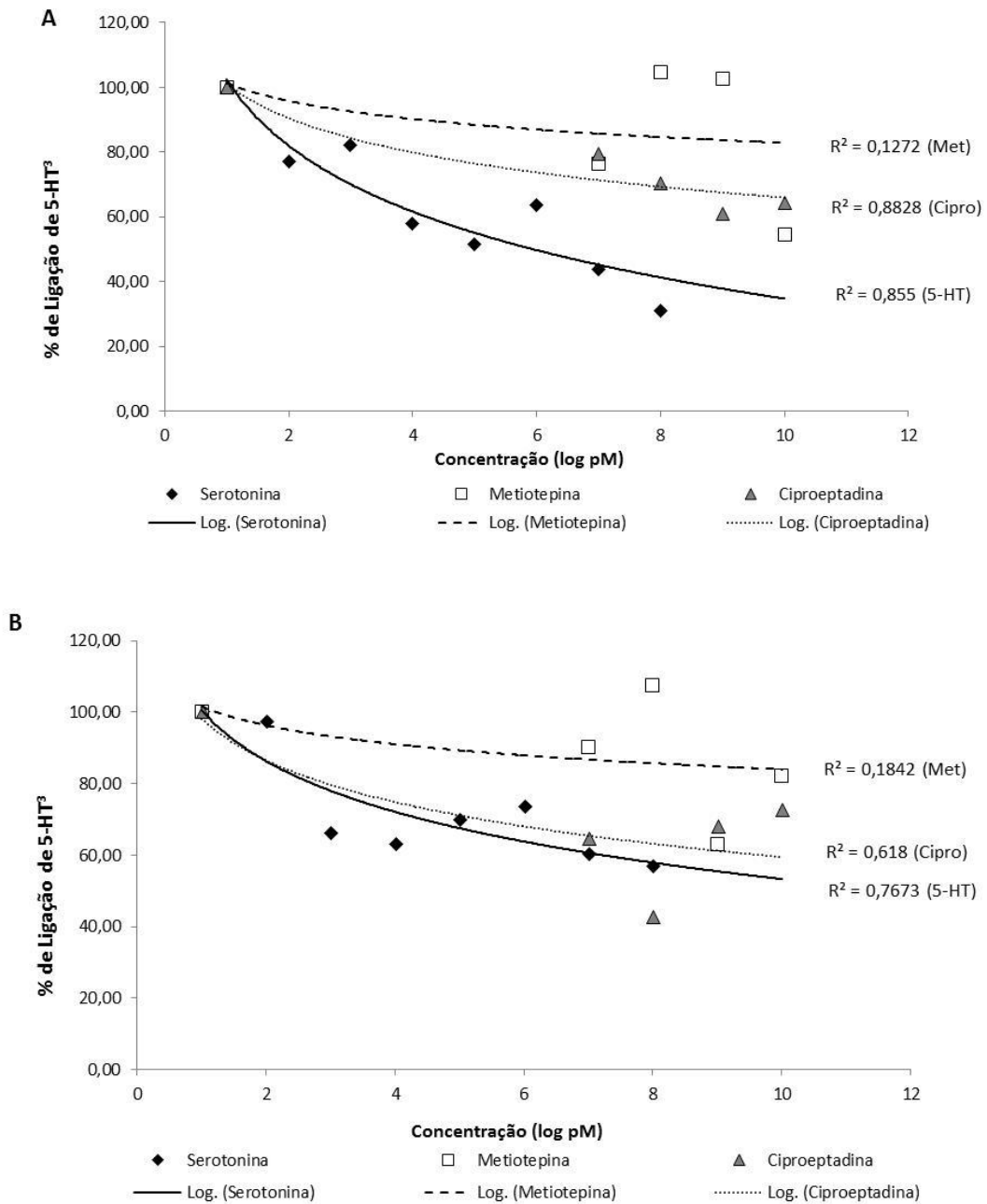


Figura 24 - Curvas de competição de serotonina, metiotepina e ciproeptadina em brânquias posteriores de animais alimentados com dieta rica em proteínas (A) ou rica em carboidratos (B).

## 5. Análises histológicas

### 5.1. Coloração com hematoxilina e eosina (H.E.) e ácido periódico de Schiff (PAS);

Fotomicrografias dos cortes histológicos do hepatopâncreas do caranguejo *N. granulata* corados através da técnica de H.E. podem ser vistos na Figura 25. As análises realizadas em microscópio óptico mostram que o hepatopâncreas é constituído por vários túbulos revestidos por epitélio pseudoestratificado formado por diversos tipos celulares e apoiado em um tecido conjuntivo intersticial. O epitélio é composto por uma camada simples de células, com vários tipos celulares, distribuídas na camada simples ou pseudoestratificada, variando de acordo com a região do túbulo. Na região distal do túbulo foram encontradas células embrionárias. Nas regiões média e proximal foram encontrados três tipos celulares: secretória, absorptiva e fibrilar. Esse padrão histológico é o mesmo descrito previamente para outros crustáceos (Yang et al., 2007; Franceschini-Vicentini et al., 2009).

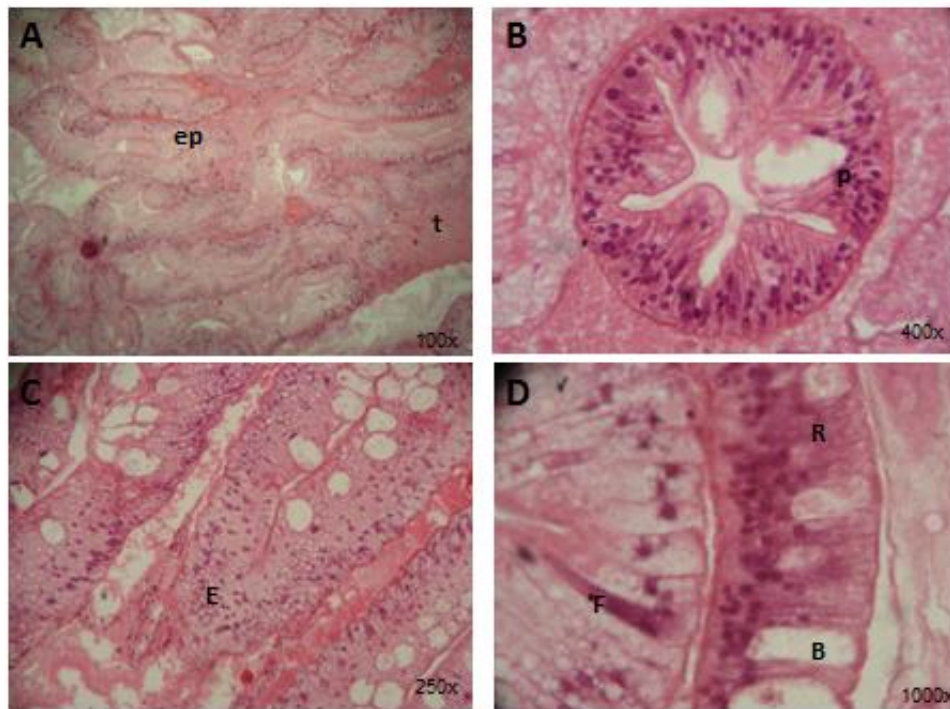


Figura 25 - Fotomicrografias de cortes histológicos do hepatopâncreas em coloração H.E.. A) Visão geral do hepatopâncreas constituído por vários túbulos com epitélio (ep) apoiado em tecido conjuntivo intersticial (t). B) Detalhe de um túbulo em corte transversal mostrando uma camada simples de células ou pseudoestratificada (p). C) Região distal do túbulo mostrando células embrionárias (E). D) Detalhe do epitélio do túbulo mostrando uma célula secretória (B), absorptiva (R) e fibrilar (F). Aumentos de 100x (A), 250x (B), 400x (C) e 1000x (D).

A Figura 26 representa fotomicrografias de cortes histológicos do hepatopâncreas corados através da técnica de PAS. Não foi observada reação PAS positiva no epitélio das amostras de hepatopâncreas. Porém, no interstício, aparecem reações PAS positivas.

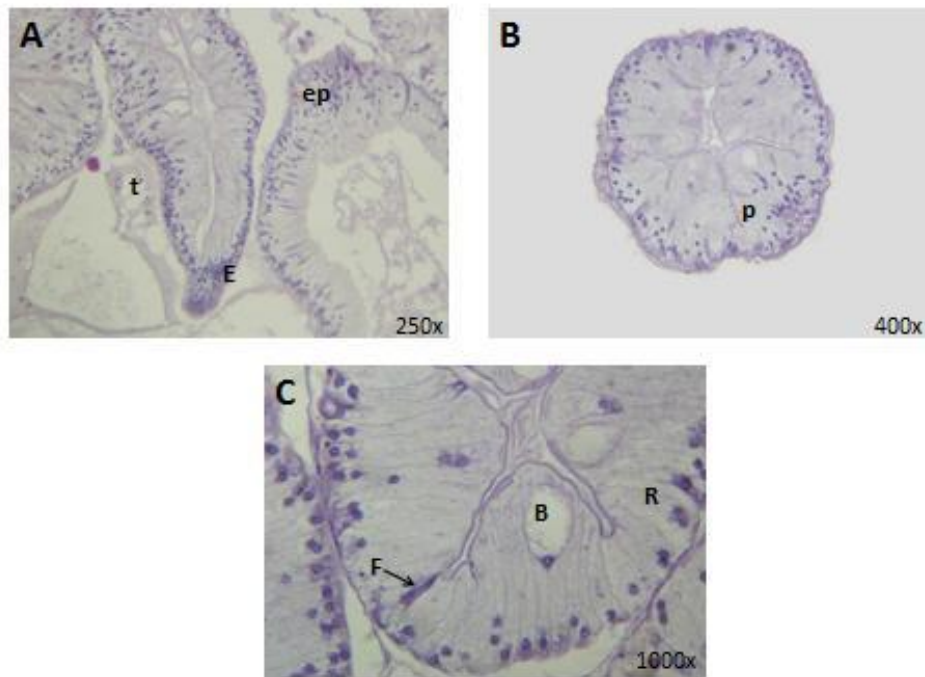


Figura 26 - Fotomicrografias de cortes histológicos do hepatopâncreas em coloração PAS. A) Túbulo em corte longitudinal mostrando tecido conjuntivo intersticial (t) e epitélio (ep) formado por camada simples de células ou pseudoestratificada, destacando a região distal do túbulo constituído por células embrionárias (E). B) Detalhe do túbulo em corte transversal mostrando epitélio pseudoestratificado (p). C) Detalhe do epitélio do túbulo mostrando uma célula secretória (B), absorptiva (R) e fibrilar (F). Aumentos de 250x (A), 400x (B) e 1000x (C).

Os cortes histológicos do músculo mandibular do caranguejo *N. granulata* estão representados por fotomicrografias na Figura 27, através da técnica de coloração H.E. (Figuras 27A e 27B) e coloração PAS (Figura 27C). O músculo mostrou-se composto por feixes longos, fibras musculares cilíndricas, inseridas em um delicado tecido conjuntivo queratinizado, distribuído entre as fibras. As fibras são orientadas em direções longitudinal e transversal, com organização dos sarcômeros típica dos vertebrados, apresentando citoplasma estriado acidófilo e núcleo periférico. Esse padrão histológico é o mesmo descrito previamente para outros invertebrados (Royuela et al., 2000). Uma reação fraca ao PAS foi detectada nas fibras musculares.

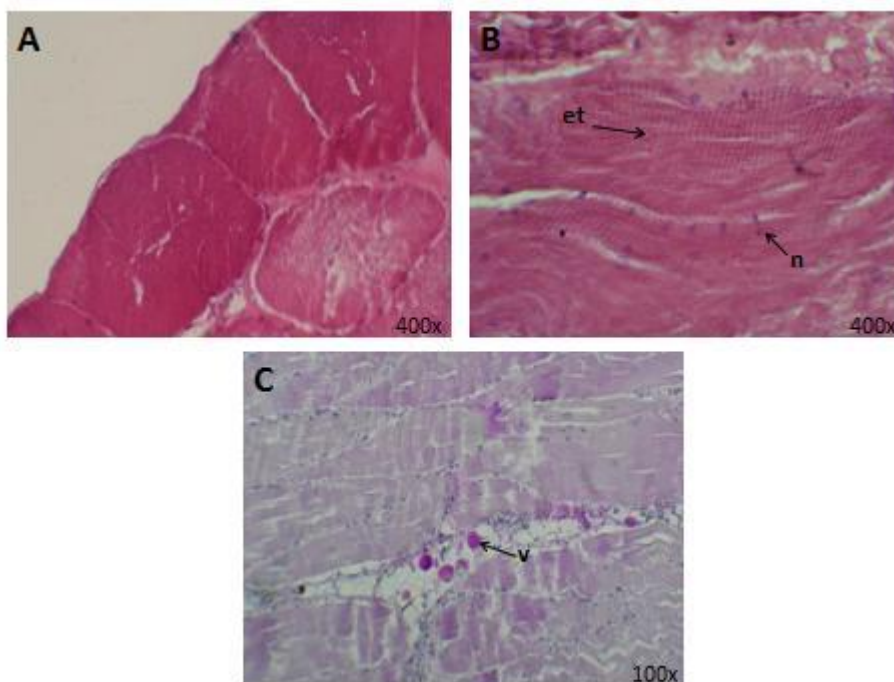


Figura 27 - Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo mandibular em coloração H.E. (A e B) e PAS (C). A) Fibras musculares cilíndricas em corte transversal. B) Fibras musculares em corte longitudinal, mostrando estriações transversais (et) com citoplasma acidófilo e núcleo (n) periférico. C) Fibras musculares em corte longitudinal, detalhando vesícula (v) positiva ao PAS. Aumentos de 100x (C) e 400x (A e B).

A Figura 28 representa fotomicrografias dos cortes histológicos das brânquias anteriores do caranguejo *N. granulata* coradas com a técnica de H.E.. As análises realizadas em microscópio óptico mostram que as brânquias anteriores são constituídas por projeções lobuladas de dobras simples, que aumentam a superfície entre ar ou água e a hemolinfa. A parede interior das lamelas apresenta uma cutícula fina que recobre o epitélio que separa o lúmen da circulação das câmaras branquiais. Existem numerosos seios e vasos hemolinfáticos com muitos hemócitos, preenchendo o espaço e parede interior das lamelas. O epitélio das lamelas é composto por uma camada simples de células fina, e com células pilares, ionócitos e estriações perpendicular à cutícula, distribuídas na região

proximal da lamela, de acordo com o padrão já descrito no *N. granulata* por Genovese et al., 2000 e Halperin et al., 2000.

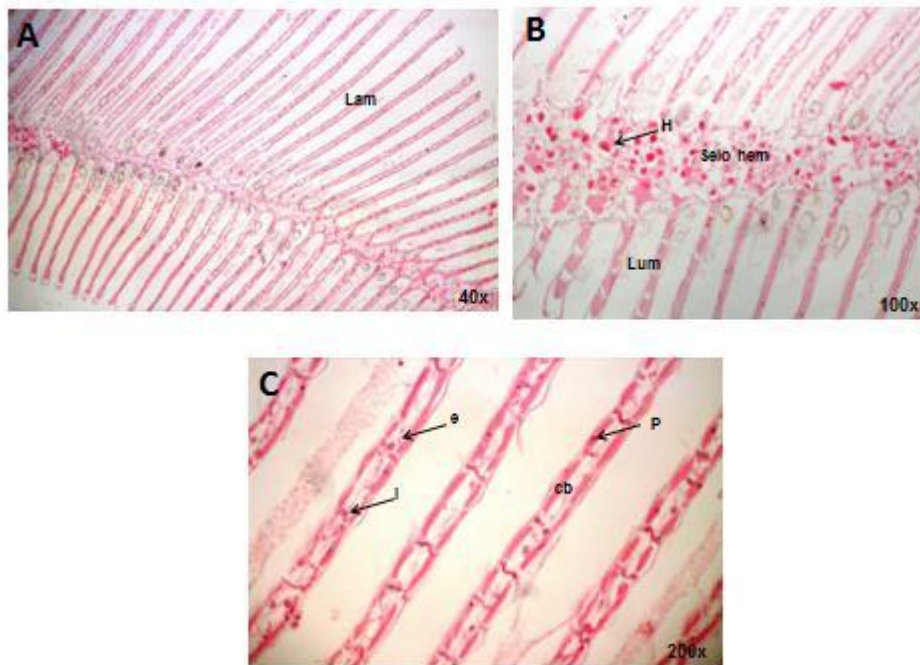


Figura 28 - Fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias anteriores do caranguejo *N. granulata* em coloração H.E.. A) Visão geral da estrutura das brânquias anteriores constituída por várias lamelas (Lam) de dobra simples. B) Detalhe das lamelas em corte longitudinal mostrando o seio hemolinfático (Seio hem) com muitos hemócitos (H), no interior das lamelas e o lúmen (Lum) entre as lamelas. C) Lamelas em corte longitudinal mostrando as câmaras branquiais (cb) e estriações (e), detalhando células do tipo ionócitos (I) e células pilar (P). Aumentos de 40x (A), 100x (B) e 200x (C).

As fotomicrografias dos cortes histológicos das brânquias posteriores coradas com a técnica de H.E., estão representados na Figura 29. As brânquias posteriores apresentam histologia semelhante às brânquias anteriores. Possuem numerosos seios e vasos hemolinfáticos com muitos hemócitos, preenchendo o espaço e parede interior das lamelas. O epitélio das lamelas é composto por uma parede interna, onde se encontram os núcleos das células respiratórias, distribuídas por toda câmara branquial (Genovese et al., 2000; Halperin et al., 2000).



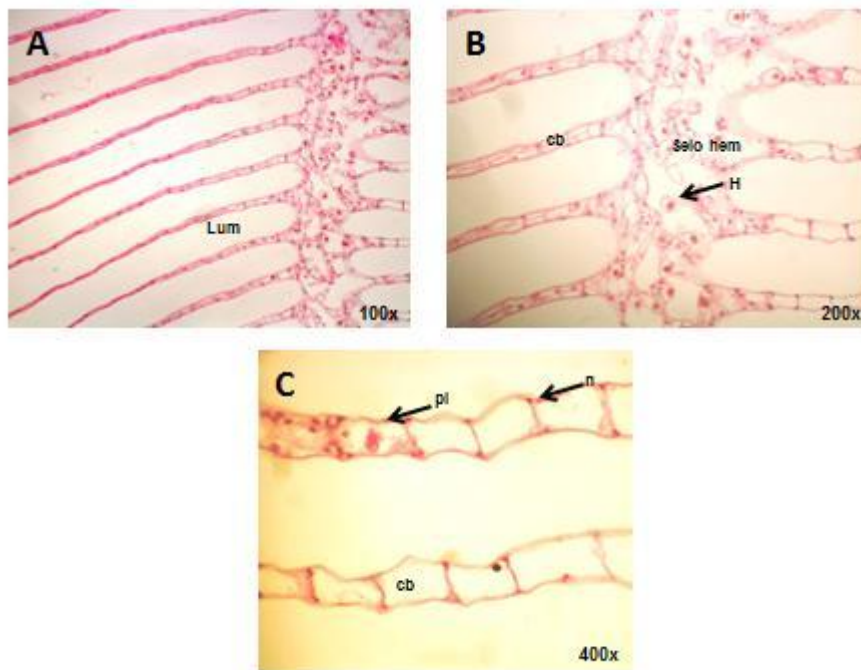


Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias posteriores em coloração H.E.. A) Detalhe das lamelas em corte longitudinal mostrando o lúmen (Lum) entre as lamelas. B) Detalhe do seio hemolinfático (Seio hem) e hemócitos (H), no interior das lamelas, mostrando também as numerosas câmaras branquiais (cb). C) Câmara branquial (cb) detalhando a parede interna (PI) e núcleo (n) do epitélio respiratório. Aumentos de 100x (A), 200x (B) e 400x (C).

### 5.3. Observação do sistema nervoso com coloração azul de metileno

Está representado na Figura 30, fotomicrografia do corte histológico das brânquias anteriores coradas com a técnica azul de metileno, de acordo com o padrão descrito no sistema nervoso de insetos (*Ephestia kuehniella* e *Tenebrio molitor*), vertebrados (cérebro murino) e invertebrados (*Lumbricos terrestris*) (Breidbach, 1987; Müller, 1989). Conforme observado, não foram encontradas terminações nervosas próximas ou se inserindo nas lamelas branquiais, nos cortes analisados em microscópio óptico, tanto em brânquias anteriores como posteriores do caranguejo *N. granulata*.



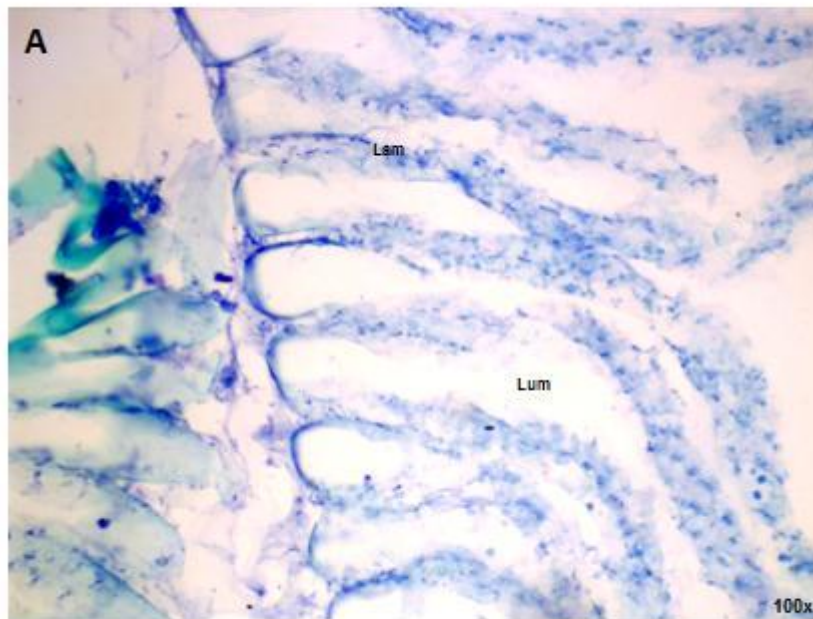


Figura 30 - Fotomicrografia de corte histológico da brânquia anterior do caranguejo *N. granulata*, em coloração azul de metileno. A) Detalhe das lamelas (Lam) em corte longitudinal mostrando o lúmen (Lum) entre as lamelas. Aumento de 100x (A).

#### 5.4. Imunoistoquímica

Na Figura 31, observam-se fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias anteriores do caranguejo *N. granulata* coradas com a técnica H.E. (Figura 31A), e submetidos ao procedimento de imunoistoquímica para serotonina (Figura 31B). Também são apresentados cortes de medula espinal de rato *Wistar*, que foram utilizados como controle positivo da técnica de imunoistoquímica (Figura 31C). As imagens das brânquias posteriores não foram anexadas no trabalho, pois obtiveram o mesmo resultado das brânquias anteriores. Pode-se observar nos cortes da medula espinal, a existência de numerosos neurônios imunorreativos à serotonina, o que pode ser visto através do aparecimento de um precipitado da cor

parda, indicando a presença de serotonina no tecido. Já, nas brânquias anteriores e posteriores, não se observou qualquer imunorreatividade ao neurotransmissor.

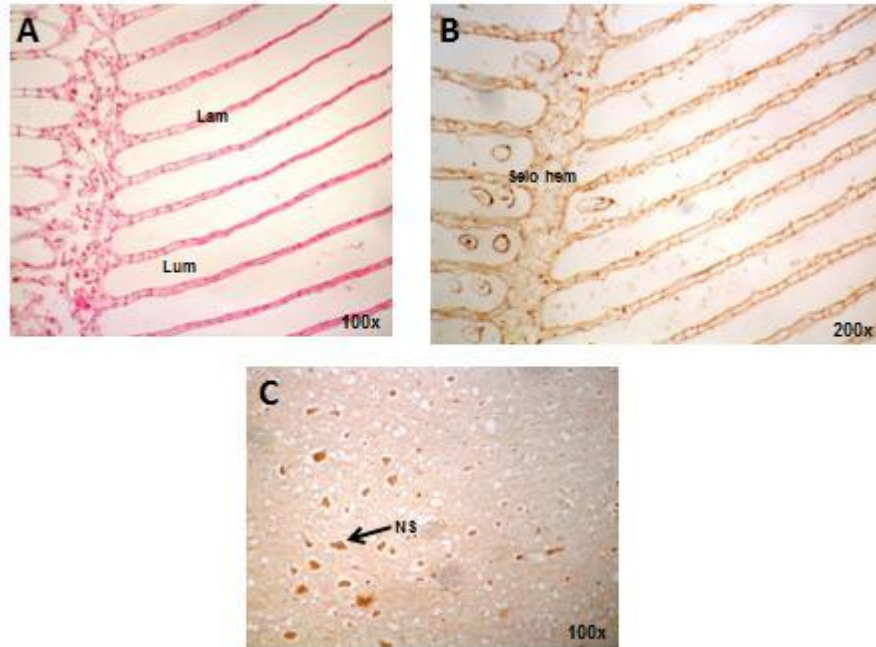


Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos das brânquias anteriores em coloração H.E. (A) e após o procedimento de imunoistoquímica para a serotonina (B). Fotomicrografia de corte histológico de medula espinal de rato submetido ao procedimento de imunoistoquímica para a serotonina (C). A) Detalhe das lamelas (Lam) em corte longitudinal mostrando o lúmen (Lum) entre as lamelas. B) Detalhe do seio hemolinfático (Seio hem) no interior das lamelas. C) Detalhe da medula espinal de rato mostrando neurônios imunorreativos à serotonina (NS). Aumentos de 100x (A e C) e 200x (B).

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Estudos “*in vivo*”

Resultados de estudos sobre o metabolismo energético em crustáceos tem demonstrado que fatores hormonais, ambientais e nutricionais controlam a homeostase da glicose (Kucharski e Da Silva, 1991b; Fanjul-Moles, 2006; Antunes et al., 2010). O presente trabalho mostra que fatores nutricionais relacionados às dietas oferecidas aos caranguejos interagem com a serotonina, controlando a homeostase da glicose.

Nos animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC), os níveis de glicose na hemolinfa aumentam significativamente quando comparados àqueles dos animais alimentados com dieta rica em proteínas (RP) o que está de acordo com trabalhos anteriores (Kucharski e Da Silva, 1991b; Vinagre e Da Silva, 1992; Zanotelli et al., 2002).

A dieta administrada aos animais altera os níveis de glicogênio no músculo e hepatopâncreas (Figuras 8 (A e B) e 9 (A e B)). Em ambos os tecidos, os valores de glicogênio presentes são mais elevados nos animais alimentados com dieta RC quando comparados com os animais da dieta RP. Estes resultados estão de acordo com os resultados de Kucharski e Da Silva (1991b) e Oliveira et al., (2001). Nas brânquias anteriores e posteriores, a dieta oferecida aos animais não alterou os níveis de glicogênio presente nestes tecidos (Figuras 6 (A e B) e 7 (A e B)), o que já havia sido descrito por Vinagre e Da Silva (1992), onde os valores de glicogênio diminuíram progressivamente ao longo do jejum, chegando a valores nulos após dois meses.

A análise histológica do hepatopâncreas e do músculo pela técnica H. E. revelou características morfológicas típicas de crustáceos (Côrrea et al., 2002; Yang et al., 2007; Franceschini-Vicentini et al., 2009), semelhantes em animais alimentados com as dietas RC e RP. Apesar da concentração de glicogênio nestes tecidos ser afetada pela composição da dieta, não foram identificadas diferenças entre lâminas submetidas à coloração de PAS, método usado para identificar a presença de polissacarídeos (glicogênio, glicoproteína, proteoglicanos) em tecidos, entre amostras de ambas dietas. Também não foram identificadas diferenças entre animais controle e tratados com serotonina e antagonistas. No músculo, reações PAS positiva foram identificadas tanto nas fibras musculares como no tecido intersticial. No entanto, no hepatopâncreas, grandes vesículas com reação PAS positiva foram identificadas apenas no espaço intersticial. O espaço intersticial pode estar preenchido por hemócitos, os quais possuem alta concentração de glicogênio e reação PAS positiva (Johnston et al., 1971;1973; Côrrea et al., 2002). No hepatopâncreas do caranguejo *Carcinus maenas*, Stentiford et al., (2005) descreveram a presença de células ricas em reservas de inclusão no espaço intersticial.

A análise histológica com coloração H. E. nas brânquias (Figura 28) revelou características morfológicas semelhante às descritas por outros autores (Genovese et al., 2000; Halperin et al., 2000). As imagens das brânquias em H. E., serviram como base para análise das imagens obtidas com as técnicas de imunohistoquímica e coloração com azul de metileno.

Conforme observado nos resultados da técnica de coloração azul de metileno (Figura 30), não foram encontradas terminações nervosas próximas ou se inserindo nas lamelas branquiais, e também não se observou qualquer neurônio imunorreativo à serotonina tanto nas brânquias anteriores como posteriores (Figura

31). Estes resultados sugerem que a serotonina seja liberada através de órgãos do sistema neuroendócrino para a hemolinfa do *N. granulata*, e tenha ação como neuro-hormônio sobre as brânquias, conforme descrito em trabalhos realizados anteriormente em crustáceos (Fingerman et al., 1994; Tiu et al., 2005; Meeratana et al., 2006; Sathyanandam et al., 2008).

Os resultados apresentados neste trabalho sobre os efeitos da injeção de 5-HT sobre os valores glicêmicos presentes na hemolinfa do caranguejo *N. granulata* (Figura 5 (A e B)) estão de acordo com trabalhos anteriores confirmando sua ação hiperglicemiante (Bauchau e Mengeot, 1966; Sedlmeier, 1985; Santos et al., 1987; Fingerman e Nagabhushanam, 1992; Lee et al., 2000; Santos et al., 2001; Zanotelli et al., 2002; Komali et al., 2005; Reddy e Pushpalatha, 2007; Sathyanandam et al., 2008), sugerindo que além do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) a serotonina também possa regular os valores de glicose hemolinfática agindo diretamente sobre os tecidos, ou através de sua ação neuromoduladora sobre o pedúnculo ocular estimulando a secreção do CHH.

A administração de metiotepina, antagonista de receptores 5-HT<sub>1</sub> de mamíferos, apresentou o mesmo efeito hiperglicemiante observado com a administração de serotonina em animais alimentados com ambas as dietas. No entanto, a ciproptadina, antagonista de receptores 5-HT<sub>2</sub>, bloqueou a ação hiperglicemiante da serotonina nos animais alimentados com dieta RP, que apresentaram normoglicemia, mas o mesmo efeito não foi observado nos animais da dieta RC. Estes resultados sugerem que os receptores serotoninérgicos envolvidos no controle do metabolismo de carboidratos possam ter um mecanismo de ação similar aos receptores 5-HT<sub>2</sub> de mamíferos. Este efeito da ciproptadina já foi observado no camarão *Squilla mantis* e no lagostim *Astacus leptodactylus* alimentados com peixe e cama-

rão ou carne bovina e fígado (dietas RP), respectivamente, antagonizando o efeito hiperglicemiante da serotonina (Lorenzon et al., 2004). No lagostim *P. clarkii*, injeção de DOI (1- (2,5-dimetóxi-4-iodofenil) isopropilamina), agonista 5HT<sub>2A</sub>, causou hiperglicemia enquanto o antagonista de 5HT<sub>2A</sub> cetanserina bloqueou a hiperglicemia induzida por serotonina (Lee et al., 2000).

A administração de serotonina, metiotepina e ciproetidina não alteraram os valores de glicogênio no músculo e no hepatopâncreas 60 e 120 minutos após a sua administração. A administração de metiotepina diminuiu os valores de glicogênio nas brânquias anteriores dos animais alimentados com dieta RP, mas o mesmo não foi observado nos animais da dieta RC e nas brânquias posteriores de ambas as dietas. Desta forma, a elevação da glicemia nos animais RP poderia ser em parte explicada pela redução do glicogênio nos animais que foram tratados com metiotepina.

Baseados nestes resultados, a ação hiperglicemiante da serotonina não parece ser devida a depleção dos níveis de glicogênio presente nos tecidos analisados dos animais RC, sugerindo que o aumento dos níveis de glicose observados ocorra devido a utilização de outra via metabólica, como a gliconeogênese. A gliconeogênese também poderia estar envolvida na hiperglicemia dos animais RP.

Em camundongos, Watanabe et al., (2010) também verificaram hiperglicemia após injeção de serotonina. Este aumento na glicemia foi acompanhado de elevação na concentração de glicogênio e na atividade da enzima PEPCK no fígado. O aumento na atividade da PEPCK também foi verificado por Laporta et al., (2013) em ratas gestantes alimentadas com triptofânio ou hidroxitriptofânio. Estes precursores também causaram aumento na concentração de serotonina no plasma, no fígado e na glândula mamária.

No *N. granulata*, a capacidade gliconeogênica e a atividade da PEPCK foram demonstradas no hepatopâncreas, brânquias anteriores e posteriores e músculo (Oliveira e Da Silva, 1997; Chittó, 2000; Vinagre e Da Silva, 2002). Oliveira e Da Silva (1997), evidenciaram pela primeira vez, a presença da via gliconeogênica e a atividade da PEPCK no hepatopâncreas do *N. granulata*. Neste trabalho, a comparação da capacidade de síntese de glicose a partir de alanina-C<sup>14</sup> com aquela a partir do lactato-C<sup>14</sup>, demonstrou que o substrato preferencial para a síntese de glicose pelo hepatopâncreas é a alanina, e em animais alimentados, a capacidade intrínseca do hepatopâncreas em sintetizar glicose é alta e independe do tipo de dieta administrada (RC ou RP). Sugerem que a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica permite ao *N. granulata* responder a variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, temperatura, ciclo das marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose, principal substrato energético em crustáceos.

Os resultados apresentados neste trabalho sobre a postura dos animais (Figura 10) após injeção de 5-HT ( $5,69 \times 10^{-2}$  moles/ caranguejo) estão de acordo com trabalhos anteriores realizados em crustáceos e no *N. granulata*, mostrando que a administração de serotonina promove uma forte flexão de membros e abdome (Fingerman e Nagabhushanam, 1992; Vinagre, 1999; Tierney e Mangiamele, 2001; Vinagre et al., 2004).

A administração do antagonista metiotepina ( $2,21 \times 10^{-2}$  moles/ caranguejo) promoveu um relaxamento da musculatura, ação oposta a observada com o uso da serotonina em animais alimentados com a dieta RC e com a dieta RP. Quando administrado metiotepina seguida da serotonina, pode-se observar que o antagonista bloqueou parcialmente a ação da serotonina, pois observou-se uma postura

intermediária nos animais, sugerindo a existência de receptores com perfil farmacológico similar aos receptores 5-HT<sub>1</sub> de mamíferos no sistema nervoso periférico. No lagostim *P. clarkii*, o mapeamento imunocitoquímico com a utilização de anticorpo anti-5-HT<sub>1Crus</sub> revelou a presença destes receptores por todo o sistema nervoso e no músculo flexor abdominal, sugerindo que a participação destes receptores no controle postural (Spitzer et al., 2005).

A ciproeptadina ( $10^{-3}$  moles/ caranguejo) não alterou a reação postural no *N. granulata*. Quando a serotonina foi administrada após a ciproeptadina foi observada a mesma reação postural observada após a injeção de serotonina. Resultado similar foi descrito por Aggio et al., (1996) nesta mesma espécie de caranguejo. Estes autores verificaram que a ciproeptadina reduz a reação de escape 30 minutos e 24h após a injeção. Porém, a sensibilização de longo prazo induzida por serotonina não foi antagonizada pela ciproeptadina, estes autores sugeriram a existência de dois tipos de receptores serotoninérgicos no *N. granulata*.

Em crustáceos, já foram identificados e clonados receptores com perfil farmacológico similar aos receptores de 5-HT da família 5-HT<sub>1</sub> (denominados 5-HT<sub>1-like</sub>) e 5-HT<sub>2</sub> (denominados 5-HT<sub>2-like</sub>) em espécies de lagosta, lagostim e camarão (Lee et al., 2000; Tierney, 2001; Tierney e Mangiamele, 2001; Lee et al., 2001; Clark et al., 2004; Sosa et al., 2004; Tiu et al., 2005; Ongvarrasopone et al., 2006; Calderón-Rosete et al., 2006; Meeratana et al., 2006; Spitzer et al., 2008).

No presente trabalho, a localização dos receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo *N. granulata* foi realizada através da ligação específica de serotonina triciada (5-HT-H<sup>3</sup>) nos tecidos, após determinação da curva de tempo para administração adequada da mesma. Para identificação do



perfil farmacológico dos receptores, utilizamos antagonistas de receptores serotoninérgicos de mamíferos 5-HT<sub>1</sub> (metiotepina) e 5-HT<sub>2</sub> (ciproeptadina).

Os resultados obtidos através destes experimentos (Figuras 11 (A e B), 12 (A e B) e 13 (A e B)) serão discutidos separadamente, por tecido estudado, para facilitar o entendimento.

No músculo mandibular, observou-se que a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> não é alterada em função do tempo de injeção, e apresenta baixa ligação quando comparado com os demais tecidos estudados em ambas as dietas. A administração de 5-HT juntamente com 5-HT-H<sup>3</sup> promove redução da ligação em seus receptores em animais do campo demonstrando a especificidade da ligação. Nos animais em dieta RC ou RP, a 5-HT não alterou a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em relação ao grupo controle, sugerindo um possível efeito da dieta sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. Com a administração dos antagonistas neste tecido, verificou-se que a metiotepina diminuiu a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nos animais alimentados com dieta RC, mas o mesmo não foi observado nos animais da dieta RP. A ciproeptadina não alterou a ligação. Estes resultados em conjunto com os obtidos na reação postural reforçam a hipótese da presença de receptores com perfil farmacológico similar aos 5HT<sub>1</sub> de mamíferos no músculo.

No hepatopâncreas, verificou-se que a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>, assim como no músculo mandibular, não é alterada em função do tempo de injeção, e também apresenta baixa ligação quando comparado com os demais tecidos estudados em ambas as dietas. A dopamina promoveu aumento da ligação nos animais alimentados com dieta RP em relação ao grupo serotonina, mas a 5-HT não alterou a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em relação ao grupo controle. Nos animais RC não foram encontradas diferenças na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> entre os tratamentos, sugerindo um

possível efeito da dieta sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. A administração de 5-HT juntamente com 5-HT-H<sup>3</sup> promove redução da ligação em seus receptores em animais do campo demonstrando a especificidade da ligação. Como este resultado não foi obtido nos animais tratados com as dietas RC e RP reforça a hipótese de que fatores metabólicos associados às dietas possam interferir na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> aos receptores. A administração de ciproeptadina neste tecido promove diminuição da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em relação ao grupo metiotepina nos animais da dieta RP, mas o mesmo não foi observado nos animais da dieta RC. Estes resultados sugerem a presença de receptores com perfil farmacológico distinto dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>.

No coração, observou-se que a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> não é alterada em função do tempo de injeção, e que apresenta ligação intermediária quando comparado com os demais tecidos estudados em ambas as dietas. Verificou-se que igualmente ao músculo e hepatopâncreas, a administração de 5-HT juntamente com 5-HT-H<sup>3</sup> promoveu redução da ligação em seus receptores em animais do campo demonstrando a especificidade da ligação, no entanto, a administração de 5-HT aos animais tratados com as dietas RC e RP não alterou a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> neste tecido, sugerindo novamente um possível efeito da dieta sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>. Os antagonistas não bloquearam a ação da serotonina neste tecido em animais alimentados com ambas as dietas. Estes resultados sugerem a presença de receptores com perfil farmacológico distinto dos receptores 5-HT<sub>1</sub> e 5-HT<sub>2</sub>.

Em ambas as brânquias, os resultados mostraram que o tempo de injeção altera a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nestes tecidos, ocorrendo redução aos 30 e 60 minutos nos animais da dieta RP e aos 60 minutos nos animais da dieta RC. Estes tecidos

apresentam alta ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> quando comparados com os demais tecidos estudados em ambas as dietas, sendo que as brânquias posteriores apresentam a maior ligação de todos. Em estudo similar no *N. granulata*, as brânquias anteriores e posteriores também foram os tecidos com maior ligação de Insulina-I<sup>125</sup> (Kucharski et al., 1997). No caranguejo chinês *Eriocheir sinensis*, as brânquias posteriores também apresentaram maior ligação ao SCH233903-(H<sup>3</sup>), antagonista de receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, que as brânquias anteriores (Mo et al., 2002).

Nos animais alimentados com dieta RP, a administração de 5-HT reduziu a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores e nas brânquias posteriores, confirmando a especificidade da ligação. Nestes animais, a administração de dopamina também reduziu a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores. Receptores dopaminérgicos D<sub>1-like</sub> e D<sub>2-like</sub> nas brânquias posteriores de *N. granulata* foram propostos por Halperin et al., (2004). Em crustáceos, a dopamina é sintetizada no órgão pericárdico e secretada na hemolinfa. Em caranguejos aquáticos, a dopamina atua sobre as brânquias estimulando a captação de íons pela via AMPc- PKA - Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase enquanto no caranguejo terrestre *Birgus latro*, a mesma via de sinalização leva à inibição da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase (Morris, 2001). Considerando o hábito semi-terrestre de *N. granulata* não é de surpreender que o mecanismo de ação da dopamina seja uma combinação de ambos mecanismos de sinalização. A sinalização da dopamina envolve a participação dos receptores D<sub>1-like</sub> e D<sub>2-like</sub>. Os receptores D<sub>1-like</sub> produzem AMPc como segundo-mensageiro, PKA como efetor secundário e a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase como proteína-alvo e fosfatases como moduladores negativos (Halperin et al., 2004). O fato da dopamina ter reduzido a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> sugere que esta monoamina também possui afinidade pelos receptores de serotonina ou que a dopamina possa agir como neuromoduladora e desta forma,

influenciar a ligação da serotonina aos seus receptores causando uma *down-regulation*: a ativação da PKA pela dopamina via receptores D<sub>1</sub> poderia levar a um aumento nos níveis de cálcio citoplasmático, alterar o potencial de membrana, influenciando de forma negativa a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> aos seus receptores.

A metiotepina promoveu aumento da ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> em ambas as brânquias, enquanto a ciproetadina não interferiu na ligação. Em mamíferos, a metiotepina é considerada antagonista de todos receptores da família 5-HT<sub>1</sub>. O receptor 5-HT<sub>1B</sub> pode agir como um auto-receptor, inibindo a secreção de serotonina (Newman-Tancredi et al., 2003; Plytliak et al., 2011). Se os receptores 5-HT nas brânquias de *N. granulata* possuem perfil farmacológico similar aos receptores 5-HT<sub>1B</sub> de mamíferos, a inibição na secreção da serotonina endógena favoreceria a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> explicando este aumento na ligação devido a administração de metiotepina.

Em crustáceos, os mecanismos de recaptção de serotonina parecem ter um papel no controle de modificações comportamentais, pois alguns efeitos da administração de serotonina podem ser bloqueados pela fluoxetina (Huber, 2005; Vasques-Acevedo et al., 2009). A administração de fluoxetina, inibidor da recaptção de serotonina, no caranguejo *C. maenas* causou efeito distinto da injeção de serotonina sobre o comportamento locomotor. Segundo estes autores, a fluoxetina, ao aumentar os níveis de serotonina endógena, poderia ativar receptores serotoninérgicos distintos do que a injeção de serotonina (serotonina exógena) e, desta forma, apresentar efeitos diferentes (Mesquita et al., 2011).

Nos animais alimentados com dieta RC e do campo, não foram observadas alterações na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> com o uso de 5-HT, dopamina e antagonistas em

ambas as brânquias, mostrando novamente que a dieta pode estar interferindo na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>.

## 5.2 Estudos “*in vitro*”

As curvas de tempo deste trabalho demonstram que os tempos escolhidos não interferem na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> nas brânquias anteriores enquanto nas posteriores observa-se aumento da ligação aos 30 minutos, justificando a escolha deste tempo para os demais experimentos.

Tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores, as curvas de competição entre 5-HT-H<sup>3</sup> e serotonina em caranguejos alimentados com dieta RP ou RC mostram que a serotonina inibe a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de forma dose-dependente, demonstrando a especificidade da ligação. Estes resultados mostram pela primeira vez a existência de receptores de serotonina nas brânquias do caranguejo *N. granulata*. Este efeito é mais pronunciado nos animais RP, sugerindo novamente o efeito da dieta sobre a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup>.

Apesar da metiotepina não ter inibido a ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> de forma dose-dependente, observa-se uma diminuição de aproximadamente 61% na ligação nas brânquias anteriores e 46% nas brânquias posteriores de animais alimentados com dieta RP. Esta diminuição na ligação de 5-HT-H<sup>3</sup> não foi observada nos animais alimentados com a dieta RC. Em conjunto, estes resultados sugerem que a metiotepina atue como um antagonista em ambas as brânquias e que o seu efeito é influenciado pela dieta. Desta forma, fica proposta a existência de receptores do tipo 5-HT<sub>1</sub>.

A ciproptadina reduziu a ligação 5-HT-H<sup>3</sup> em aproximadamente 50% nas brânquias anteriores e de cerca de 40% nas brânquias posteriores de animais

alimentados com a dieta RP. Estes efeitos não foram dose-dependentes e não foram observados em animais alimentados com a dieta RC. Em conjunto, estes resultados sugerem que a ciproeptadina atue como um antagonista em ambas as brânquias e que o seu efeito é influenciado pela dieta. Desta forma, fica evidenciada a existência de receptores do tipo 5-HT<sub>2</sub>.

Embora a sequência de proteínas e segundo-mensageiros associados aos receptores de 5-HT sejam relativamente bem conservados em todas as espécies, seus perfis farmacológicos podem variar significativamente entre vertebrados e invertebrados, e mesmo entre diferentes espécies de um mesmo grupo, como os crustáceos decápodes (Tierney, 2001; Spitzer et al., 2008). Estudos sugerem que crustáceos expressam diferentes tipos de receptores de 5-HT e que a expressão ou sinalização destes receptores podem mudar em resposta a estímulos social e ambiental. Isto não é surpreendente uma vez que não seria de se esperar uma seleção a favor ou contra os aminoácidos envolvidos na ligação de ligantes sintéticos (Spitzer et al., 2008).

## 6. CONCLUSÃO

1. O presente trabalho propõe a existência de receptores serotoninérgicos nos seguintes tecidos-alvo periféricos do caranguejo *N. granulata*: brânquias posteriores e anteriores, coração, hepatopâncreas e músculo mandibular.

2. Fatores nutricionais relacionados às dietas oferecidas aos caranguejos interagem com a serotonina, controlando a homeostase da glicose.

3. A dieta oferecida aos animais interfere na ligação da serotonina em seus receptores nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo *N. granulata*.

4. Existem provavelmente três tipos de receptores serotoninérgicos nos tecidos-alvo periféricos do caranguejo *N. granulata*: um receptor 5-HT<sub>1Neo</sub> com perfil similar ao receptor 5-HT<sub>1</sub> de mamífero; um receptor 5-HT<sub>2Neo</sub> com perfil similar ao receptor 5-HT<sub>2</sub> e provavelmente, um terceiro, o 5-HT-H<sup>3</sup><sub>Neo</sub> com perfil farmacológico indeterminado.

## 7. PERSPECTIVAS

A realização deste trabalho deu início a muitas descobertas sobre a serotonina e seus efeitos sobre os tecidos alvo-periféricos do caranguejo *N. granulata*, bem como a comprovação da existência de receptores nos tecidos estudados e seus perfis farmacológicos.

No entanto, muitas informações sobre este neuro-hormônio ainda precisam ser investigadas. Para isto, pretende-se:

1. Dosar os níveis de serotonina na hemolinfa do caranguejo *N. granulata*.
2. Testar o efeito da serotonina sobre a gliconeogênese, glicogênese e oxidação da glicose *in vitro*.
3. Isolar e caracterizar a estrutura química dos receptores serotoninérgicos do caranguejo *N. granulata*.
4. Clonar os receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1Neo</sub>, 5-HT<sub>2Neo</sub> e 5-HT-H<sup>3</sup><sub>Neo</sub> e transfectar em células HEK (*Human Embryonic Kidney 293*).



## REFERÊNCIAS

AGGIO, J.; RAKITÍN, A.; MALDONADO, H. 1996. Serotonin- induced short- and long- term sensitization in the crab *Chasmagnathus*. **Pharmacol. Biochem. and Behavior.** **53 (2):**441-448.

AIRES, M. M. e cols. . 2008. FISILOGIA - **Capítulo 3 – Sinalização Celular.** 3ªed. Ed. Guanabara Koogan.

ANTUNES, G.F.; AMARAL, A.P.N.; RIBARCKI, F.P.; WILLAND, E.F.; ZANCAN, D.M.; VINAGRE, A.S. 2010. Seasonal Variations in the Biochemical Composition and Reproductive Cycle of the Ghost Crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. **J. Exp. Zool.** **313A:** 280-29.

BAUCHAU, A. G.; MENGEOT. 1966. Sérotonine et glycémie chez les Crustacés. **Experientia**, **22:** 238-239.

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.

BREIDBACH, O. 1987. A Rapid Methylene Blue Staining Procedure For The Ventral Nerve Cord of Holometabolous Insects. **Institute for Developmental Physiology, Cologne University.** **Vol. 62, nº 6.**

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER K. L. 2006. Capítulo 11: Agonistas e Antagonistas dos Receptores de 5-hidroxitriptamina (Serotonina). In: Sanders-Bush, E.; Mayer, S. E. Goodman e Gilman – **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 11ª.ed., Ed. Mc Graw Hill.

CALDERÓN-ROSETTE, G.; FLORES, G.; RODRIGUEZ-SOSA, L. 2006. Diurnal rhythm in the levels of serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the crayfish eyestalk. **Synapse** **59:** 368-373.

CERESÉR, K. M.; VIANNA, M. R. (2004). Capítulo 2: Neurotransmissores. In: **Kap-zinski, F.; Quevedo, J. E Izquierdo, I. Organizadores. Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos**. 2ª.ed., Ed. Artmed.

CHITTÓ, A.L., 2000. Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. **Master thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.**

CHITTÓ, A. L. F.; SCHEIN, V.; ETGES, R.; LUIZ CARLOS KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. 2009. Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. **Invertebrate Biology**, 1–8.

CLARK, M. C.; DEVER, J. J.; XU, P; REHDER, V. SOSA, M. A.; BARO, J. 2004. Arthropod 5-HT<sub>2</sub> receptors: a neurohormonal receptor in decapod crustaceans that displays agonist independent activity resulting from an evolutionary alteration to DRY motif. **J. Neurosci.** **24 (13):** 3421.

COHEN, J. E.; ONYIKE, C.U.; MCELROY, V. L.; LIN, A. H.; ABRAMS, T. W. 2003b. Pharmacological characterization of an adenylyl cyclase-coupled 5-HT receptor in aplysia: comparison with mammalian 5-HT receptors. **J Neurophysiol** **89:** 1440–1455.

CORRÊA JR, J. D.; FARINA, M.; ALLODI, S. 2002. Cytoarchitectural features of *Ucides cordatus* (Crustacea Decapoda) hepatopancreas: structure and elemental composition of electron-dense granules. **Tissue e Cell.** **34(5):**315-325.

CSIZMADIA, E. & CSIZMADIA, V. 2009. Detection of apoptosis in tissue sections. In: Erhardt, P. & Toth, A (eds.). Apoptosis: **Methods in Molecular Biology. Vol. 559:** 49-63. Editora Springer.

DA SILVA, R. S. M.; KUCHARSKI, L. C. R. 1992. EFFECT OF HYPOSMOTIC STRESS ON THE CARBOHYDRATE METABOLISM OF CRABS MAINTAINED ON HIGH PROTEIN OR CARBOHYDRATE-RICH DIET. **Camp. Biochem. Physiol.** **Vol. 101A (3):** 631-634.

DEAN, J. M., VENBERG, F. J. (1965) Variations in the blood glucose level of crustacea. **Comp. Biochem. Physiol.** **14**, 29-34.

DUMITRIU, B.; COHEN, E. J.; WAN, Q.; NEGROIU, A. M.; ABRAMS, T. W. 2006. Serotonin Receptor Antagonists Discriminate Between PKA- and PKC-Mediated Plasticity in Aplysia Sensory Neurons. **J Neurophysiol** **95**: 2713-2720.

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. (1997). Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. **Physiol. Zool.** **70(3):**257-269.

FINGERMAN, M.; 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.

FRANCESCHINI-VICENTINI, I. B.; RIBEIRO, K.; PAPA, L. P.; MARQUES JUNIOR, J.; VICENTINI, C. A.; VALENTI, P. M. C. M. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. **Int. J. Morphol.**, **27(1):**121-128.

FRASSETTO, S. S.; RUBIO, A. D. S.; LOPES, J. J.; PEREIRA, P.; BRUM, C.; KHAZZAKA, M.; VINAGRE, A. S. 2006. Locomotor and peripheral effects of sibutramine modulated by 5-HT<sub>2</sub> receptors. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** **84**:1239-1244.

FREIRE, C. A.; ONKEN, H.; MCNAMARA, J. C. 2008. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comp. Biochemistry and Physiology**, **151 (A)**: 272–304

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. 2004. **Capítulo 11: Farmacologia do Sistema Nervoso Central. In: Thaddeu, R. C. Farmacologia Clínica – Fundamentos da terapêutica racional.** 3ª.ed., Ed. Guanabara Koogan.

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.

GENOVESE, G.; LUQUET, C. M.; PAZ, D. A.; ROSA, G. A.; PELLERANO, G. N. 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. **J. Anat.** **197**: 239-246.

GILLES, R. 1982. Osmoregulatory process in mollusk and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Anim. USP** **6**: 1–36.

HALPERIN, J.; ANSALDO, M.; PELLERANO, G.N.; LUQUET, C.M. 2000. Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851 — physiological and morphological studies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** **126**: 341–349.

HALPERIN, J.; GENOVESE, G.; TRESGUERRES, M.; LUQUET, C. M. 2004. Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* by dopamine and cAMP. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A.**

HUBBER, R. 2005. Amines and motivated behaviors: a simpler systems approach to complex behavioral phenomena. **J. Comp. Physiol. A** (**191**): 231 – 239.

JACOBY, J.H.; SHABSHELOWITZ, J.D.; FERNSTROM, J.D.; WURTMAN, R.J. 1975. The mechanisms by which methiothepin, a putative serotonin receptor antagonist, increases brain 5-hydroxyindole levels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol 195 (2): 257-263.**

JOHNSTON, M. A.; DAVIES, P. S.; ELDER, H. Y. 1971. Possible hepatic function for crustacean blood cells. **Nature Vol. 230, 471-472.**

JOHNSTON, M. A.; ELDER, H. Y.; DAVIES, P. S. 1973. Cytology of *Carcinus* haemocytetes and their function in carbohydrate metabolism. **Comp. Biochem. Physiol. Vol. 46A: 569-581.**

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. 2004. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. Capítulo2 – Neurotransmissores.** 2ª ed. Ed. Artmed.

KATZUNG, B. G. 2006. Capítulo X : Histamina, Serotonina e Alcalóides do Esporão do Centeio. In: **Katzung, B. G. Farmacologia Básica e Clínica.** 9ª.ed., Ed. Guanabara Koogan.

KOMALI, M.; KALARANI, V.; VENKATRAYULU, C.; REDDY, D. C. S. 2005. Hyperglycaemic effects of 5-hydroxytryptamine and dopamine in the freshwater prawn, *Macrobrachium malcolmsonii*. **J. Exp. Zool. 303A: 448-455.**

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.

KUCHARSKI, L. C. R.; DA SILVA, R. S. M.; (1991b) Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.** **99A (4)**: 215-218.

KUCHARSKI, L. C.; RIBEIRO, M. F.; SCHEIN, V.; DA SILVA, R. S. M.; MARQUES, M. 1997. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **J. of Experimental Zoology** **279**: 118-125.

LAM, D. D.; HEISLER, L.K. 2007. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes. **Expert reviews in molecular medicine.** **Vol 9 (5)**:1-15.

LAPORTA, J.; PETERS, T. L.; MERRIMAN, K. E.; VEZINA, C. M.; HERNANDEZ, L. L. 2013. Serotonin (5-HT) Affects Expression of Liver Metabolic Enzymes and Mammary Gland Glucose Transporters during the Transition from Pregnancy to Lactation. **www.plosone.org.** **Vol. 8 (2)**: e57847.

LEE, C.Y.; YAU, S.M.; LIAU, C.S.; HUANG, W.J. 2000. Serotonergic regulation of blood glucose levels in the crayfish, *Procambarus clarkii*: site of action and receptor characterization. **The Journal of Experimental Zoology** **286**: 596-605.

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

LORENZON, S.; BREZOVEC, S.; FERRERO, E. A. 2004. Species-specific Effects on Hemolymph Glucose Control by Serotonin, Dopamine, and L-Enkephalin and Their Inhibitors in *Squilla mantis* and *Astacus leptodactylus* (Crustacea). **Journal of Experimental Zoology** **301 A**: 727–736.

LORET, S.; VAN DER GOOR, N.; DEVOS, P. (1989). Suspensions d'Hémocytes et d'Hépatopancréatocytes pour L'étude, *IN VITRO*, de la charge en Glucose chez un Crustacé Décapodé. **Océanis**, **v.15(4)**:419-431.

LUQUET, C. M.; GENOVESE, G.; ROSA G. A.; PELLERANO, G. N. 2002. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. **Mar. Biol.** **141**: 753–760.

MEERATANA, P.; WITHYACHUMMARNKUL, B.; DAMRONGPHOL, P.; WONGPRASERT, K.; SUSEANGTHAM, A.; SOBHON, P. 2006. Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. **Aquaculture** **206**: 315-325.

MELLOR, H.; PARKER, P. J. 1998. The extended protein kinase C superfamily. **Biochem. J.** **332**: 281- 292.

MERCER, A. R.; EMPTAGE, N.J.; CAREW, T.J. 1991. Pharmacological Dissociation of Modulatory Effects of Serotonin in *Aplysia* Sensory Neurons. **SCIENCE**, **VOL. 254**: 1811-1813.

MESQUITA, S. R.; GUILHERMINO, L.; GUIMARÃES, L. 2011. Biochemical and locomotor responses of *Carcinus maenas* exposed to the serotonin reuptake inhibitor fluoxetine. **Chemosphere** **85**:967-976.

MO, J. L.; DEVOS, P.; TRAUSCH, G. 2002. Dopamine D1 receptors in the gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*. **Comp. Biochem. and Physiology Part C** **131**: 433–438.

MORRIS, S. 2001. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. **J. Exp. Biol.** **204**: 979–989.

MÜLLER, T. 1989. Local Supravital Staining with Methylene Blue as Marking Technique for Neurons. **Z. mikrosk.-anat. Forsch. Leipzig.** **103 (6)**: 967-970.

NEWMAN-TANCREDI, A.N.; CUSSAC, D.; MARINI, L.; TOUZARD, M E MILLAN, M.J., 2003. 5-HT<sub>1B</sub> receptor-mediated constitutive G $\alpha_{i3}$ -protein activation in stably

transfected Chinese hamster ovary cells: an antibody capture assay reveals proteina efficacy of 5-HT. **British Journal of Pharmacology** **138**: 1077-1084.

OLIVEIRA, G.T., DA SILVA, R.S.M., 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. **Marine biology**, **139**: 335-342.

OLIVEIRA, G.T., DA SILVA, R.S.M., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol., Part A** **118**, 1429–1435.

ONGVARRASOPONE, C.; ROSHORM, Y.; SOMYONG, S.; POTHIRATANA, C.; PETCHDEE, S.; TANGKHABUANBUTRA, J.; SOPHASAN, S.; PANYIM, S. (2006). Molecular cloning and functional expression of the *Penaeus monodon* 5-HT receptor. **Biochimica et Biophysica Acta** **1759**: 328-339.

PELSTER, B.; SCHWERTE, T. 2012. The paracrine role of 5-HT in the control of gill blood flow. **Respiratory Physiology & Neurobiology** **184**: 340– 346

PEROUTKA, S. J. (1987). Serotonin receptors. In: **Psychopharmacology: The Third Generation of Progress**. MELTZER HY (ed), Raven Press, New York, 303-311.

POPOVA, N.K. 2009. From genes to aggressive behaviour: the role of the serotonergic system. **Neurosciences and Behavioral Physiology** **38(5)**: 471-475.

PYTLIAK, M.; VARGOVÁ, V., MECHÍROVÁ, V.; FELŠÖCI, M. (2011). Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. **Physiol. Res.** **60**: 15-25.

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.



REDDY, P.S.; PUSHPALATHA, T. 2007. Effect of serotonin on hemolymph glucose regulation in the fresh water edible crab *Oziotelphusa senex senex*. **Aquaculture** **266**: 274-278.

ROYUELA, M.; FRAILE, B.; ARENAS, I. M.; PANIAGUA, R. 2000. Characterization of Several Invertebrate Muscle Cell Types: A Comparison With Vertebrate Muscles. **Microscopy Research and Technique** **48**:107–115.

SANTOS, E. A.; BALDISSEROTO, B.; BIANCHINI, A.; COLARES, E. P.; NERY, L. E. M.; MANZONI, G. C. (1987). Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, **88A (1)**: 21-25.

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

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

SEDLMEIER, D. (1985) Mode action of the crustacean hyperglycemic hormone. **Amer. Zool.** **25**, 223-232.

SIEBERS, D.; LEWEK, K.; MARKUS, H.; WINKLER, A. 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. **Mar. Biol.** **69**: 37–43.

SILVA, E.C. (2002). Capítulo 33: Neurotransmissão Aminérgica Central. In: **Farmacologia**. Silva, P. Editor. Farmacologia. 6a.ed, Ed. Guanabara Koogan.

SPITZER, N.; ANTONSSEN, B.I.; EDWARDS, D.H. 2005. Immunocytochemical Mapping and Quantification of Expression of a Putative Type 1 Serotonin Receptor in the Crayfish Nervous System. **J. of Comp. Neurology** **484**: 261-282.

SPITZER, N.; EDWARDS, D.H. AND BARO, D.J. 2008. Conservation of Structure, Signaling and Pharmacology Between two Serotonin Receptor Subtypes from Decapod Crustaceans, *Palinurus interruptus* and *Procambarus clarkii*. **The Journal of Experimental Biology** **211**: 92 – 105.

SOSA, M. A.; SPITZER, N.; EDWARDS, D. H.; BARO, D. J. 2004. A Crustacean Serotonin Receptor: Cloning and Distribution in the Thoracic Ganglia of Crayfish and Freshwater Prawn. **J. Comp. Neurology** **473**:526–537.

SOSSIN, W. S.; SACKTOR, T. C.; SCHWARTZ, J. H. 1994. Persistent activation of protein kinase C during the development of long-term facilitation in *Aplysia*. **Learn Mem** **1**: 189–202.

STENTIFORD, G. D.; FEIST, S. W. 2005. A histopathological survey of shore crab (*Carcinus maenas*) and brown shrimp (*Crangon crangon*) from six estuaries in the United Kingdom. **J. of Invertebrate Pathology** **88**: 136-146.

SUNDIN, L.; DAVISON, W.; FORSTER, M.; AXELSSON, M. 1998. A Role of 5-HT<sub>2</sub> Receptors in the Gill Vasculature of the Antarctic Fish *Pagothenia borchgrevinki*. **The Journal of Experimental Biology** **201**: 2129–2138.

TIERNEY, A. J. (2001). Structure and Function of Invertebrate 5-HT Receptors: A Review. **Comp. Biochem. Physiol. Part A** (**128**): 791-804.

TIERNEY, AJ. AND MANGIAMELE, L.A. 2001. Effects of Serotonin and serotonin analogs on posture and agonistic behavior in crayfish. **J. Comp. Physiol. A** **187**: 757-767.

TIU, S.H.K.; HE, J.G. AND CHAN, S.M. 2005. Organization and expression study of the shrimp (*Metapenaeus ensis*) putative 5-HT Receptor: Up-regulation in the brain by 5-HT. **Gene** **353**: 41-52.

WATANABE, H.; AKASAKA, D.; OGASAWARA, H.; SATO, K.; MIYAKE, M.; SAITO, K.; TAKAHASHI, Y.; KANAYA, T.; TAKAKURA, I.; WATANABE, K.; YAMAGUCHI, T.; ASO, H. 2010. Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by acceleration bile acid turnover. **Endocrinology**, **151 (10)**:4776-4786.

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.

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

VASQUES-ACEVEDO, N.; REYES-COLON, D.; RUÍZ-RODRIGUEZ, E.A; RIVERA, N.M.; ROSENTHAL, J.; KOHN, A.B.; MOROZ, L.L.; SOSA, M.A. 2009. Cloning and immunoreactivity of the 5-HT<sub>1</sub>Mac and 5-HT<sub>2</sub>Mac receptors in the central nervous system of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **J. Comp. Neurol.** **513 (4)**: 399-416.

VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M.; (1992) Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate – rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.** **102A**; 579-583.

VINAGRE, A. S. (1999). Metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: efeito do jejum e da realimentação e da apedunculção sobre a adaptação ao estresse hiposmótico. **Tese de Doutorado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M.; 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Can. J. Zool.** **80**, 1413–1421.

VINAGRE, A. S.; RIBARCKI, F. P.; AMARAL, A. P. N.; CHITTÓ, A. L. F.; NORO, C. K.; BUCKUP, L.; SILVA, R. S. M. 2004. Efeito de monoaminas sobre a contração muscular em crustáceos decápodes. **Acta Scientiae.** **6 (2)**: 19-27.

YANG, Z.; ZHAO, Y.; LI, N.; YANG, J. 2007. Effect of Waterborne Copper on the Microstructures of Gill and Hepatopancreas in *Eriocheir sinensis* and Its Induction of Metallothionein Synthesis. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **52**, 222–228.

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.

ZHANG, Y.; BENTON, J. L.; BELTZ, B. S. 2011. 5-HT receptors mediate lineage-dependent effects of serotonin on adult neurogenesis in *Procambarus clarkia*. **Neural Development**, **6 (2)**: 1-22.