DISSECÇÃO FARMACOLÓGICA DA NEUROTRANSMISSÃO MONOAMINÉRGICA EM NAUPHOETA CINEREA: SEROTONINA COMO INIBIDOR DA RESPOSTA MOTORA

Yuri Correia Barreto [1]

Raquel Soares Oliveira [2]

Lúcia do Canto Vinadé [3]

Maria Eduarda Rosa [4]

Chárist on André Dal Belo [5]

Tális de Oliveira Silva [6]

Resumo:

INTRODUÇÃO: As monoaminas (Dopamina, Noradrenalina, Adrenalina Serotonina e Histamina), além da sinalização, exercem a neuromodulação de variadas funções fisiológicas. No sistema nervoso central (SNC) a 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina está relacionada ao ritmo circadiano, atividade motora, regulação da temperatura, nocicepção, apetite, humor, comportamento sexual e secreção hormonal. Enquanto no sistema nervoso periférico (SNP), ela é correlacionada ao sistema simpático e outras funções viscerais. Em invertebrados a 5-HT também é encontrada no SNC, principalmente nas células mushroom bodies, regulando o comportamento de aprendizagem, a agressividade, alimentação e a fisiologia sensorial. Por outro lado, no SNP de insetos modula respostas eletrofisiológicas e viscerais. O presente estudo teve o objetivo de investigar o papel da serotonina no comportamento neurolocomotor de baratas da espécie Nauphoeta cinerea através de utilização de fármacos antagonistas e agonistas monoaminérgicos. METODOLOGIA: Baratas adultas Nauphoeta cinerea foram utilizadas como modelo experimental. A atividade neuromuscular foi avaliada usando a preparação músculo coxal adutor metatorácico (MCAM) segundo descrito por Martinelli et al. (2014). Para avaliar a atividade locomotora in vivo, quatro insetos foram filmados durante 10 min e os filmes analisados utilizando softwares conforme Adedara et al. (2015). Todos os dados foram expressos como E.P.M, sendo os mesmos analisados pelo teste two-way ANOVA, seguido dos testes Tukey ou Dunnett, sendo considerado significativos quando P

Palavras-chave: Serotonina; Neuromodulação; Fluoxetina; Reserpina: Aminas Biogênicas; Invertebrados

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

DISSECÇÃO FARMACOLÓGICA DA NEUROTRANSMISSÃO MONOAMINÉRGICA EM NAUPHOETA CINEREA: SEROTONINA COMO INIBIDOR DA RESPOSTA MOTORA

[1] Aluno de graduação. y.barreto9507@gmail.com. Autor principal

[2] Pôs-graduanda. raquelsoaresoliv@gmail.com. Co-autor

[3] Docente. luvinade@gmail.com. Co-autor

[4] Discente. rosaedumaria@gmail.com. Co-autor

[5] Docente. charistonbelo@unipampa.edu.br. Orientador

[6] Pôs-Graduanda. talis.biologia@gmail.com. Co-orientador

DISSECÇÃO FARMACOLÓGICA DA NEUROTRANSMISSÃO MONOAMINÉRGICA EM *Nauphoeta cinerea*: SEROTONINA COMO INIBIDOR DA RESPOSTA MOTORA

1. INTRODUÇÃO

Dentre os neurotransmissores centrais existem algumas monoaminas importantes, conhecidas como aminas biogênicas (Dopamina, Noradrenalina, Adrenalina Serotonina e Histamina) que, além da sinalização, exercem a neuromodulação de variadas funções fisiológicas. No sistema nervoso central (SNC) a 5-hidroxitriptamina (5-HT) ou serotonina está relacionada ao ritmo circadiano, atividade motora, regulação da temperatura, nocicepção, apetite, humor, comportamento sexual e secreção hormonal. Enquanto no sistema nervoso periférico (SNP), ela é correlacionada ao sistema simpático, ao trato gastrointestinal, a coagulação sanguínea e a agregação plaquetária, além de induzir resposta cronotrópica positiva sobre o sistema cardiovascular e, por consequência, no respiratório (BRUNTON., CHABNER., KNOLLMANN, 2012; MERLO et al., 2011).

A Reserpina é um alcaloide isolado do arbusto *Rauwolfia serpentina* o qual foi primariamente utilizado como tratamento anti-hipertensivo, no entanto os pacientes que faziam seu uso passaram a apresentar comportamento depressivo, alguns quadros muito graves, com isso foi descoberto que a Reserpina reduzia drasticamente os níveis de serotonina no SNC por depletar os estoques de monoaminas nas vesículas pré-sinápticas. A partir da correlação de 5-HT a ansiedade e depressão, os pesquisadores passaram a estudar todos os aspectos fisiológicos envolvendo essa substância, trabalhos com cDNA e testes farmacológicos mostraram uma gama de receptores 5-HT (R5-HTs) amplamente distribuídos nos tecidos nervosos, cada subtipo e receptor é composto por subclasses, elucidando assim uma variedade de funções moduladas por ela. Portanto, a alteração da homeostase deste neurotransmissor está relacionada a uma série de condições fisiopatológicas. (BLENAU & THAMM, 2011; BRUNTON., CHABNER., KNOLLMANN, 2012; TADAIESKY, 2005; De PRÀ).

Em invertebrados a 5-HT também é encontrada no SNC, principalmente nas células *mushroom bodies,* regulando o comportamento de aprendizagem, a agressividade, alimentação e a fisiologia sensorial. Por outro lado, no SNP de insetos modula respostas eletrofisiológicas e viscerais. Claramente as propriedades farmacológicas dos sistemas serotoninérgicos são comuns às de mamíferos, mas com algumas pequenas diferenças. Isso possibilita a substituição de modelos animais vertebrados, atualmente utilizados, por invertebrados. Além disso, sua capacidade de manipulação experimental e o paralelismo biofísico torna seu uso muito conveniente para abordagens neurofisiológicas aplicáveis a humanos, de forma imprescindível para as pesquisas biomédicas (BLENAU & THAMM, 2011; OSBORNE, 1996; PANDEY & HABIBULLA, 1980; PANDEY & HABIBULLA, 1982;).

O presente estudo teve o objetivo de investigar o papel da serotonina no comportamento neurolocomotor de baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* através de utilização de fármacos antagonistas e agonistas monoaminérgicos.

2. METODOLOGIA

a. Animais: Foram utilizadas baratas da espécie *Nauphoeta cinerea* (Olivier) de ambos os sexos. Os animais alojados em insetário localizado no biotério do Campus São Gabriel da UNIPAMPA, com temperatura controlada (22-25°C), com água e ração *ad libitum*.

b. Registros da Atividade Locomotora: Os registros de atividade locomotora *in vivo*, foram realizados usando-se quatro animais colocados individualmente em uma caixa de poliestireno (25cm de comprimento x 15cm de largura x 7cm de altura), tendo uma webcam (logitech® HD) afixada acima do sistema a qual permitiu a filmagem e o monitoramento do comportamento exploratório dos animais durante 10 minutos conforme descrito em Leal *et al*. (2018). Todos os experimentos foram realizados durante o mesmo período do dia. Os registros foram analisados usando o software IDtracker® seguindo um script ad-hoc desenvolvido no software Matlab®.

c. Preparação músculo coxal adutor metatorácico (MCAM): A preparação MCAM foi montada segundo descrito por Martinelli *et al*. (2014). Após a anestesia dos animais por resfriamento a 8°C (7min) e fixação do animal com alfinetes entomológicos em decúbito dorsal em uma placa recoberta com isopor, foi feita a dissecação da quitina da região metatoráxica que compreende o último par de pernas, para a exposição do nervo 05. Foi inserido um par de eletrodos bipolares de platina em alfinetes, pelos quais foram aplicados os estímulos elétricos (2-5V, 0.5 Hz, 0.5ms). A perna do animal foi amarrada com linha de costura, essa foi conectada a um transdutor isométrico acoplado a um sistema para registros eletromiográficos (AVS, São Carlos, Brasil). Os registros neuromusculares foram feitos durante 120 min.

d. Análises estatísticas: Os resultados foram expressos como a média ± EPM em porcentagem. Foi usado o teste One-way ANOVA e teste T como análise estatística, onde foram considerados significativos valores de *p<0,05, **p<0,03, ***p<0,01 e ****p<0,001; seguidos dos testes Tukey ou Dunnett. Os dados foram representados na forma de gráficos da média ± S.E.M. dos experimentos.

3 RESULTADOS e DISCUSSÃO

A Reserpina age como um antagonista inverso sob as monoaminas pela sua alta afinidade com os transportadores impedindo o armazenamento nas vesículas. Fluoxetina é um antidepressivo de ação metabólica prolongada, pertencente a classe de inibidores seletivos da recaptação de serotonina, o que resulta em potencialização da neurotransmissão serotonérgica. Outro fármaco utilizado no tratamento dos animais foi a Mianserina, cujo efeito é atribuído, principalmente, a atividade antagonista dos receptores 5-HT2 (MORENO et al. 1999).

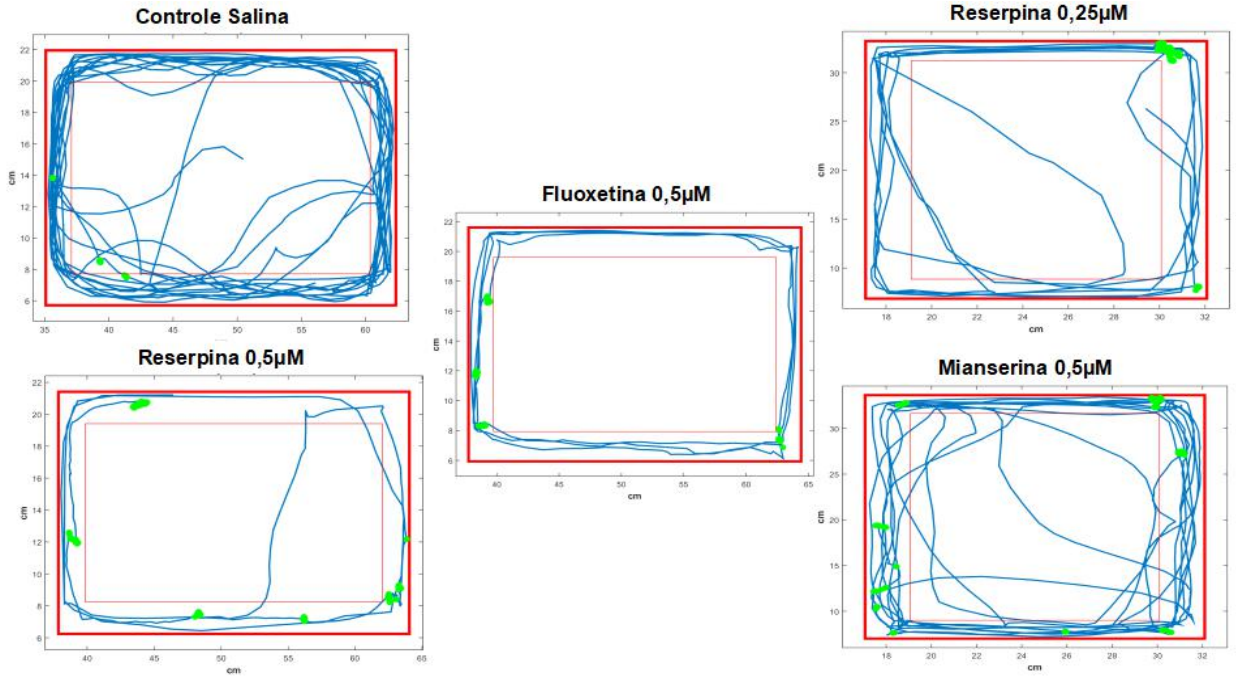


Figura 1. Representação 2D da trajetória dos animais durante os experimentos. Os Pontos verdes referem-se as zonas de maior concentração de episódios de imobilidade.

Os parâmetros avaliados no comportamento de locomoção são baseados na trajetória exploratória dos animais no ambiente experimental (Fig.1). As doses de Reserpina reduziram drasticamente a atividade locomotora (Fig. 2A), um efeito dose dependente, sendo que a dose de 0,5µM aumentou o tempo de parada para 77% ±4 ($p<0.05$) (Fig. 2C) e os episódios de imobilidade (Fig. 2B). A Fluoxetina também reduziu significativamente a distância percorrida e aumentou o tempo de parada para 69% ±3 ($p<0.05$) (Fig. 2).

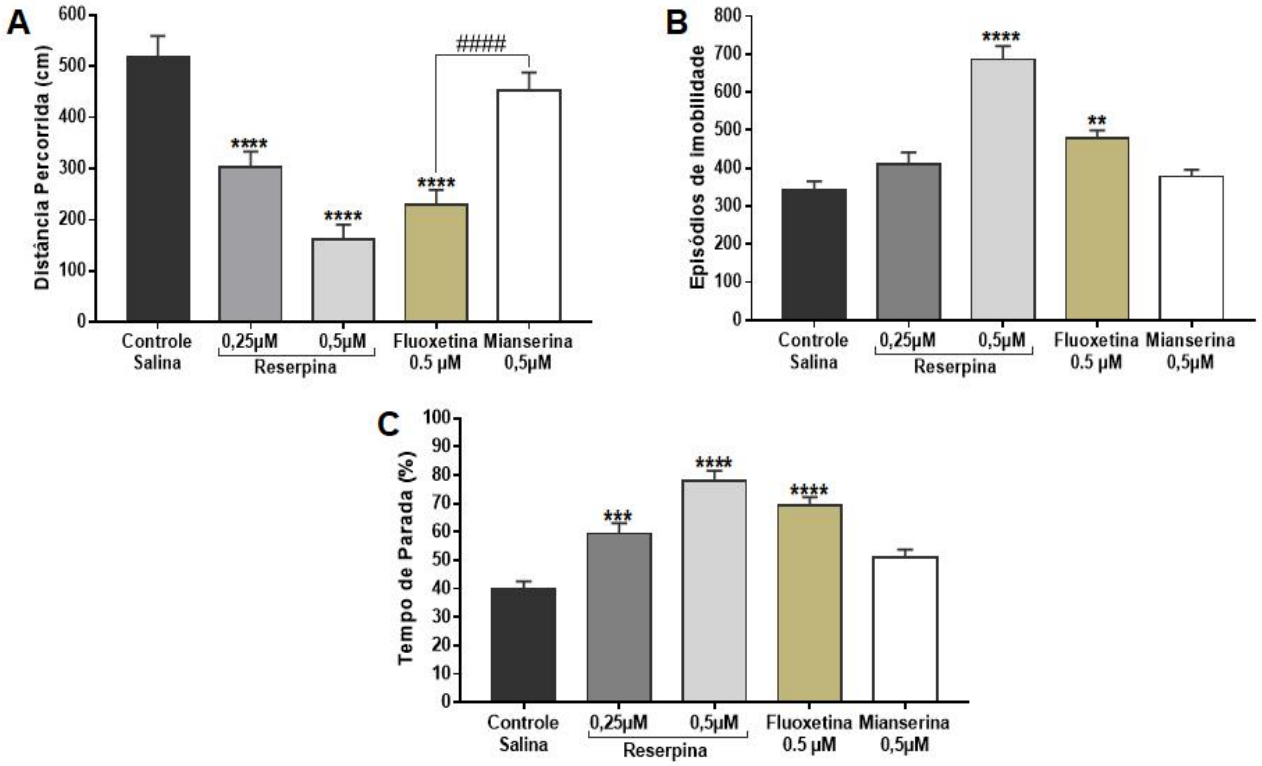


Figura 2. Gráficos resultantes dos ensaios de locomoção em *Nauphoeta cinerea* e pontos

finais motores avaliados em controle e tratamento Reserpina 0,25 e 0,5µM, Fluoxetina 0,5µM e Mianserina 0,5µM. A) Distância percorrida. B) Episódios de imobilidade. C) Tempo de parada em porcentagem. (n = 40).

Nos registros eletromiográficos para a determinação da participação da 5-HT na junção neuromuscular, a aplicação de Reserpina e Fluoxetina 0,5µM, induziu diminuição progressiva na resposta contrátil, em 60 min, sendo que a Reserpina apresentou uma redução mais significativa nesse tempo, enquanto a Fluoxetina, nos primeiros minutos, mostrou um leve aumento na contração muscular (n=4) (Figura 3). Nesses ensaios, a partir de 60 min de registros os tratamentos induziram contrações em níveis mais estáveis mantendo a resposta entre 28% a 38% do controle.

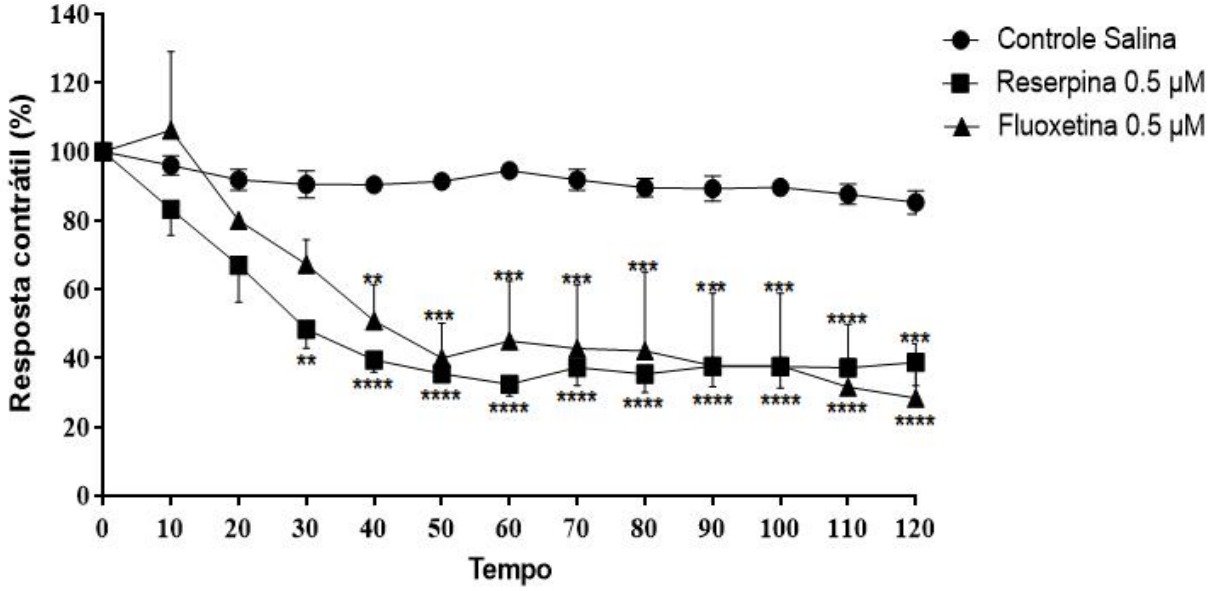


Figura 3. Resposta neuromuscular induzida pelo Controle e os tratamentos em preparações de MCAM *in vivo* em baratas da espécie *Nauphoeta cinerea*.

Os resultados apresentados nesse trabalho reforçam a importância da neurotransmissão monoaminergica para comportamento locomotor e, demonstram, que a regulação serotoninérgica é essencial para o comportamento exploratório das baratas. Esse último fato é reforçado pela redução causada pelos agonistas fluoxetina, comparada com um inibidor especifico, a mianserina. A diminuição da resposta contrátil na junção neuromuscular induzida pela fluoxetina sugere uma relação direta desse composto com mecanismos relacionádos ao ácido gama-amino-butírico (GABA), neurotransmissor inibitório da JNM de insetos. Os muitos tipos de R5-HTs e a sua distribuição nos tecidos dos insetos influencia diretamente efeitos neuronais, pois o mesmo subtipo de receptores, mas de classes diferentes, pode resultar em respostas opostas. Erber et al. 1993 mostrou através de experimentos comportamentais que a modulação de 5-HT afeta os interneurônios periféricos e o controle dos músculos, além da respostas sensitivas. Um resultado semelhante foi observado em *Drosophila melanogaster* com R5-HTs mutados, no qual o comportamento locomotor, olfativo e alimentar, bem como a frequência cardíaca foram alterados (BRUNTON., CHABNER., KNOLLMANN, 2012; De PRÁ, 2012; NECKAMEYER, 2007).

Em mamíferos tratados com reserpina também foram obtidos resultados semelhantes aos observados em invertebrados, sendo o principal efeito a hipocinesia, ou seja, a perda da

atividade motora espontânea, bradicinesia (tremor e rigidez), também ocorre à indução ao estado depressivo, apoptose e hipotermia (FADANNI, 2016: TADAIESKY, 2005).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade inibidora da resposta motora, causada pela serotonina, e os seus mecanismos de neuromodulação central e periférico em modelo de *Nauphoeta cinerea* demonstram sua importância para o desenvolvimento de modelos experimentais alternativos de doenças neurodegenerativas e comportamentais.

REFERÊNCIAS

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. ed. 12. São Paulo, 2012.

De PRÁ, M. A. A. **O ENVOLVIMENTO DOS TRANSPORTADORES DE MONOAMINAS NA CAPTAÇÃO DE SEROTONINA EM VEIAS.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ERBER, J. KLOPPENBURG, P. SCHEIDLER, A. Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. **Birkãiuser Verlag**, v. 49, p 1073-1083, 1993.

FADANNI, G. P. **PREJUÍZOS MOTORES INDUZIDOS POR ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE BAIXA DOSE DE RESERPINA E A PARTICIPAÇÃO DE UMA REGIÃO DO CROMOSSOMO 4 DO RATO (*RATTUS NORVEGICUS*).** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K.; LIGABUE-BRAUN, R.; DEFFERRARI, M. S.; PIOVESAN, A. R.; STANISÇUASKI, F.; DEMERTINI, D. R.; DAL BELO, C. A.; ALMEIDA, C. G. M.; FOLLMER, C.; VERLI, H.; CARLINI, C. R.; PASQUALI, G. Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et BiophysicaActa (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n 3, March 2014.

MERLO, S.; BRUSCO, J.; PADOVAN-NETO, F. E.; ROHNER, C. J. S.; IKEDA, E. T.; De ROSS, J. B.; RUGGIERO, R. N.; FACHIM, H. A.; MOREIRA, J. E Synaptic vesicle cycle, dendritic spines and signal transduction. **Medicine**, Ribeirão Preto, v.44, p. 157-171, 2011.

MORENO, R. A. MORENO, D. H. SOARES, M. B. M. Psicofarmacologia de antidepressivos. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 21, p. 24-40, 1999.

LEAL, A. P.; OLIVEIRA, R. S.; PERIN, A. P. A.; BORGES, B. T.; VIEIRA, P. B.; SANTOS, T. G.; VINADÉ, L.; VALSECCHI, C.; DAL BELO, C. A. Entomotoxic activity of Rhinella icterica (Spix, 1824) toad skin secretion in Nauphoeta cinerea cockroaches: An octopamine-like modulation. **Pesticide Biochemistry and Physiology,** São Gabriel, v. 148, p. 175-181, May. 2018.

TADAIESKY, M. T. **EFEITOS DOS INIBIDORES DA NOS NO MODELO DE PARKINSONISMO INDUZIDO POR RESERPINA**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2005.