

ALESSANDRA VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DO RITMO DE MUDANÇA DE COR FISIOLÓGICA DO
CARANGUEJO *Chasmagnathus granulata* SUBMETIDO A DIFERENTES
REGIMES FOTOPERIÓDICOS**

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Caliman Filadelfi

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada

**CURITIBA
2005**

Dedico esta Monografia a meus familiares e grandes amigos, Silvino, Iara, Mônica, Annelise, Gabriel e Lucas que mesmo alguns existindo há pouco tempo ensinam-me a cada momento da minha vida. Amo muito todos vocês.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus que sempre esteve comigo.

Agradeço especialmente aos meus professores por tudo que me ensinaram e por terem me respeitado, principalmente a professora Ana Maria que, quando eu estava para desanimar me trazia coragem e boa vontade para continuar nessa batalha e ao professor Fernando pela paciência e pelo carinho paternal que oferece aos seus alunos.

Ao pessoal do laboratório que sempre me ajudou quando possível e que torceu por mim, principalmente ao Gustavo, Cíntia e Eduarda que foram elementos chave durante a realização desta monografia, quando dispuseram tempo e paciência para ajudar na coleta dos dados, grandes amigos.

Reconheço os esforços que, principalmente o professor Nery, Fábio e Marcelo, da FURG de Rio Grande-RS, tiveram quando precisei que me ensinassem os mecanismos e o manuseio dos caranguejos e a disposição que tiveram em coletar e deixar tudo arranjado para eu trazer os animais para o laboratório. Agradeço a professora Carolina deste departamento pela sua boa vontade em emprestar o microscópio estereoscópico e os aeradores, ferramentas essenciais para o nosso trabalho.

Agradeço a amigos especiais que fiz durante a minha graduação, a minha grande amiga, Anna Lígia, a Mariana, Letícia, Viviane, Sabrina, Jú Fabris e tantas outras meninas que de uma forma ou de outra me trouxeram alegria, ou simplesmente uma palavra amiga. Ao Nelson, Rodrigo, Raphael, Carlos Eduardo, rapazes que sempre alimentavam profundas e divertidas discussões e não deixaram a monotonia entrar na minha vida.

A grandes e especiais amigos como Zaira, Carol, Myriam, Tati M., Tati N., Fê, Mau, Chris, Rafa, Miguel pessoas que ficaram marcadas na minha história. Ao Jackson, uma pessoa que estimo muito, que me acompanha há anos e que me conhece como poucos.

Agradeço as pessoas loucas que apareceram na minha vida, aos queridos familiares e principalmente às minhas avós que gerenciam a vida de toda minha família.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 RITMICIDADE	1
1.2 MUDANÇA DE COR	3
1.3 <i>CHASMAGNATHUS GRANULATA</i>	6
2. OBJETIVOS	10
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO	11
3.2 REGISTRO DO RITMO DE MUDANÇA DE COR DE <i>C. GRANULATA</i>	11
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	12
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

RESUMO

Este trabalho objetivou confirmar a ocorrência de ritmicidade circadiana de mudança de cor fisiológica, através da quantificação da distribuição pigmentar em melanóforos do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, submetido a três condições fotoperiódicas diferentes: (1) 12 horas de claro e 12 horas de escuro (CE12:12); (2) escuro constante (EE) e (3) claro constante (CC). Os animais foram mantidos por 8 dias na condição CE12:12 e em seguida, por 7 dias nas condições dos experimentos já citadas (1, 2 e 3). A coleta de dados (estágio de agregação – dispersão dos melanóforos) foi feita durante 72 horas, a cada duas horas, nos 3 dias finais das condições fotoperiódicas. Nas três condições experimentais foram encontrados ritmos de distribuição pigmentar ou mudança de cor fisiológica. Os pigmentos apresentaram-se mais dispersos nos melanóforos durante o dia subjetivo e mais agregados durante a noite subjetiva nas condições CE12:12 e EE. A ritmicidade detectada parece ser endógena uma vez que se manteve sob condições fotoperiódicas constantes (EE e CC). Durante a condição CC houve diferença significativa na média do valor de distribuição pigmentar e diferenças nos valores de mesor, acrofase e amplitude em comparação com as outras condições (CE12:12 e EE), demonstrando que sob luz constante o ritmo foi menos evidente e os pigmentos mantiveram-se dispersos por mais e diferentes horários do dia. Tais alterações podem estar relacionadas a uma resposta primária dos melanóforos à luz. A confirmação da ritmicidade de mudança de cor fisiológica de *C. granulata* permitirá a realização de outros experimentos para caracterização do sistema de temporização circadiano destes animais.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ritmicidade

Muitas variáveis biológicas oscilam nos organismos conferindo-lhes adaptabilidade a fatores ambientais cíclicos, tais como, alternância claro-escuro, estações do ano, variações de temperatura, tempo entre refeições ou convivência social. Se algum evento em sistemas biológicos ocorrer sistematicamente em intervalos regulares, ele é chamado de ritmo biológico, sendo o intervalo de tempo após o qual o evento ocorre, o período deste ritmo (ILLNEROVÁ, 1991). O inverso do período é a frequência, que corresponde ao número de ciclos em um determinado intervalo de tempo e a diferença entre os valores máximo e mínimo exibidos pelo parâmetro variável é a amplitude do ritmo (AFECHE, 1988).

O ritmo biológico mais comum é o diário ou circadiano ("circa", aproximadamente; "diem", dia), que corresponde a aproximadamente 24 horas e não se constitui em respostas meramente passivas à alternância claro-escuro, visto que a ritmicidade persiste num meio não periódico (geralmente escuro constante). Mas existem outros ritmos: ultradiano, com frequência menor do que 20 horas e infradiano, com frequência maior do que 28 horas. A partir da classificação básica encontramos subdivisões mais subjetivas e complexas de se caracterizar, como os ritmos circamaré, com ciclo de aproximadamente 12 horas e importantes para animais estuarinos; o circalunar e o circannual, com ciclos de cerca de 29 dias e de 12 meses, respectivamente (MARQUES & MENNA-BARRETO, 2003).

As estruturas orgânicas capazes de gerar ritmos biológicos endógenos determinados geneticamente são denominadas relógios biológicos, osciladores ou marcapassos. Graças a estes, em um meio não periódico, com dia subjetivo (fase na qual o sistema biológico comporta-se como se fosse a fase clara do ciclo noite/dia ambiental) e noite subjetiva (condição na qual o sistema biológico comporta-se como na fase escura do ciclo noite/dia ambiental) mantém-se um ritmo circadiano em livre-curso, cujo período é de aproximadamente, mas não precisamente, 24 horas (ILLNEROVÁ, 1991).

Na natureza, porém, os ritmos são ajustados ou sincronizados pelos ciclos externos chamados "zeitgebers", agentes sincronizadores ou simplesmente sincronizadores. Durante o arrastamento, a fase do ritmo biológico estabelece uma

relação estável com uma fase determinada do sincronizador. Assim, o arrastamento acontece graças a deslocamentos de fase do ritmo biológico causados pelos ciclos ambientais. A variação destes pode gerar um atraso no ritmo ou um adiantamento no mesmo, sendo este o princípio das manipulações experimentais denominadas curvas de resposta de fase (na forma abreviada, CRF). Tais curvas são representações gráficas da dinâmica do comportamento de um oscilador submetido a um pulso de estimulação administrado em diferentes horas do dia, ou seja, são representadas as relações entre a fase de exposição ao pulso, com o tamanho e direção do deslocamento de fase provocado (ILLNEROVÁ, 1991; MARQUES & MENNA-BARRETO, 2003).

A luz é um dos fatores que influi na característica adaptativa dos ritmos circadianos em plantas e animais, tanto que em todos os sistemas circadianos parece ocorrer algum modelo de fotossistema, o qual permite ao animal detectar a intensidade de luz externa para se sincronizar com o fenômeno temporal do ambiente. Em crustáceos essa percepção é principalmente decorrente dos omatídeos situados no pedúnculo ocular e do lobo óptico. Welsh (1939, 1941) sugere que a localização dos pigmentos protetores do cristalino dentro dos omatídeos varia de maneira circadiana, sendo na fase escura, o momento em que os pigmentos mais expõem os receptores luminosos e durante o dia, a fase em que os pigmentos mais os protegem. Outra forma de percepção de luz seria através das melanopsinas, que são fotopigmentos que conferem sensibilidade à luz em células ganglionares da retina e que também foram detectadas em cultura de células de melanóforos do anfíbio *Xenopus laevis*. Quando estimuladas pela luz, as melanopsinas causam dispersão pigmentar nas células citadas (ISOLDI *et al.*, 2005). Embora as melanopsinas não tenham ainda sido descritas em invertebrados, foi descrito um homólogo no cefalocordado *Branchiostoma belcheri* (KIMURA *et al.*, 2005). Assim a presença de fotopigmento extra-retinal similar em invertebrados não deve ser descartada.

No lobo óptico dos crustáceos existem ainda variados tipos de células que respondem às oscilações externas e internas do animal e secretam hormônios peptídicos reguladores de atividades como desenvolvimento, reprodução, locomoção, mudança de cor e osmolaridade sanguínea (WITHYACHUMNARNKUL *et al.*, 1992b). A existência de um sistema multioscilador (dependente do ambiente e

dos fatores intrínsecos) participando na produção do ritmo circadiano foi proposta tanto em vertebrados (WEVER, 1975; TAKAHASHI & MENAKER, 1982) quanto em invertebrados (BLOCK, 1974; CHANDRASHEKARAN & ENGELMANN, 1973; CHRISTENSEN & LEWIS, 1983).

1.2 Mudança de cor

A coloração corpórea dos animais tem um importante papel na comunicação e no mimetismo (THURMAN, 1990). Os principais pigmentos envolvidos com esta coloração incluem melaninas, omocromos, carotenóides, purinas e pteridinas. Os pigmentos localizam-se dentro de células ou em anexos epidérmicos como pêlos, penas ou cutículas. As células que sintetizam ou armazenam os pigmentos são denominadas células pigmentares ou cromatóforos e têm origem no tecido nervoso embrionário (BAGNARA, 1966; BAGNARA & HADLEY, 1973; NERY *et al.*, 1999).

O principal pigmento contido nos melanóforos de crustáceos é o omocromo; os eritróforos e xantóforos possuem os pigmentos carotenóides e pteridínicos em diferentes proporções (Ghidalia, 1985); e as purinas estão presentes nos leucóforos e iridóforos, armazenadas em grânulos nos primeiros e organizadas em placas achatadas e delgadas nestes últimos (BAGNARA, 1966; FINGERMAN, 1970; NERY, 1999).

A mudança de cor pode ser classificada em: 1 - lenta ou morfológica, levando dias a semanas, pode ocorrer em todos os animais e é decorrente de alterações na quantidade de pigmentos e/ou de células pigmentares; 2 - rápida ou fisiológica, processando-se de poucos minutos a algumas horas, ocorre em alguns invertebrados e vertebrados ectotérmicos sendo determinada por variados fatores ambientais (por exemplo, cor do fundo e temperatura) e envolvendo redistribuição ou migração dos pigmentos dentro das células pigmentares (RAO *et al.*, 1985).

A mudança de cor pode também ser classificada em: resposta primária, quando o estímulo luminoso é percebido por fotorreceptores extra-retinais (BAGNARA, 1965; BINKLEY, 1988; ROLLAG, 1988); ou resposta secundária, que depende da fotorrecepção retinal e é a mais comum entre os animais. Neste segundo caso, as informações recebidas são processadas pelo sistema nervoso, o qual induz alterações nas células pigmentares com ou sem participação do sistema endócrino (FUJII & OSHIMA, 1986).

Como os cromatóforos de crustáceos não são inervados, acredita-se que a mudança de cor, nesses animais, seja exclusivamente regulada por peptídeos. Segundo Nery & Castrucci (1997), no complexo neuroendócrino órgão X - glândula do seio, encontrado no pedúnculo ocular de crustáceos decápodes, foram identificados apenas dois peptídeos com ação sobre a mudança de cor: o hormônio dispersador de pigmento (PDH) e o hormônio concentrador de pigmento vermelho (RPCH).

O RPCH foi isolado pela primeira vez no pedúnculo ocular de *Pandalus borealis* induzindo agregação de pigmentos vermelhos em eritróforos (FERLUND & JOSEFSSON, 1972). É um octapeptídeo pertencente a uma família de hormônios de artrópodes junto com os hormônios adipocinéticos de insetos (GÄDE, 1990). Além dos eritróforos, outros cromatóforos de algumas espécies sofrem a ação do RPCH, como por exemplo, os leucóforos em *P. borealis* (JOSEFSSON, 1975) e os xantóforos em *Crangon* sp (SKORKOWSKI & BIEGNIIEWSKA, 1981). Entretanto a agregação pigmentar pelo RPCH não é generalizada para todos os tipos de cromatóforos, especialmente os melanóforos (RAO & HACKETT, 1973; FINGERMAN, 1973; GRANATO *et al.*, 2004; TUMA *et al.* 1993), sugerindo que esse hormônio é específico na indução da migração de pigmentos vermelhos. O PDH possui várias isoformas nas diferentes espécies de crustáceos. Todas as isoformas são octadecapeptídeos e exibem atividade de dispersão pigmentar em todos tipos de cromatóforos (FERNLUND, 1976; RAO *et al.*, 1985).

Apesar da função do PDH e do RPCH na migração pigmentar ter sido bem descrita, alguns estudos sugerem que outros agonistas possam também auxiliar nesta regulação. Uma forte evidência recai sobre: 1 - o peptídeo cardioativo de crustáceo (CCAP), um nonapeptídeo cíclico originariamente identificado e isolado do órgão pericárdico do caranguejo *Carcinus maenas* (STANGIER, *et al.*, 1987). Nery & Castrucci (1999) e Granato e col. (2004) verificaram a capacidade de CCAP induzir dispersão pigmentar nos eritróforos de camarões de água-doce *Macrobrachium potiuna* e nos melanóforos do caranguejo *C. granulata*; 2 - o hormônio melatonina, encontrado nos pedúnculos oculares e na hemolinfa de crustáceos decápodes (AGAPITO *et al.*, 1995; BALZER *et al.*, 1997; TILDEN *et al.*, 1997; VIVIEN-ROELS & PÉVET, 1986; WITHYACHUMNARNKUL *et al.*, 1992a, 1992b e 1995), com pico diurno de concentração na hemolinfa, diferentemente do pico noturno detectado no

plasma de vertebrados. Nery & Castrucci (1999) verificaram que apesar da melatonina não ter induzido agregação ou dispersão pigmentar *per se* em eritróforos do camarão de água-doce *Macrobrachium potiuana*, ela diminuiu significativamente a resposta destas células ao hormônio concentrador de pigmentos vermelhos (RPCH).

Geralmente as mudanças de cor em crustáceos envolvem ritmos de alternância entre dispersão e agregação de pigmentos. Estudos com espécies de crustáceos em livre-curso demonstram que há diferenças no grau de migração pigmentar entre o dia subjetivo e a noite subjetiva, e também de acordo com a cor do fundo, como por exemplo, nos camarões *Crangon sp.* e *Palaemonetes sp.* que podem adaptar-se diferentemente a substratos de cores diversas (BROWN, 1935; KOLLWE, 1927; ROBINSON & CHARLTON, 1973). Fatores como a temperatura e as radiações solares, como por exemplo, a luz visível e a radiação ultravioleta (UVR), também influenciam a mudança de cor nos animais, incluindo os crustáceos (RIBEIRO *et al.*, 2002; THURMAN, 1990).

O estado de distribuição dos pigmentos dentro dos cromatóforos pode ser definido segundo a escala sugerida por Hogben e Slome (1931) (Fig. 01).

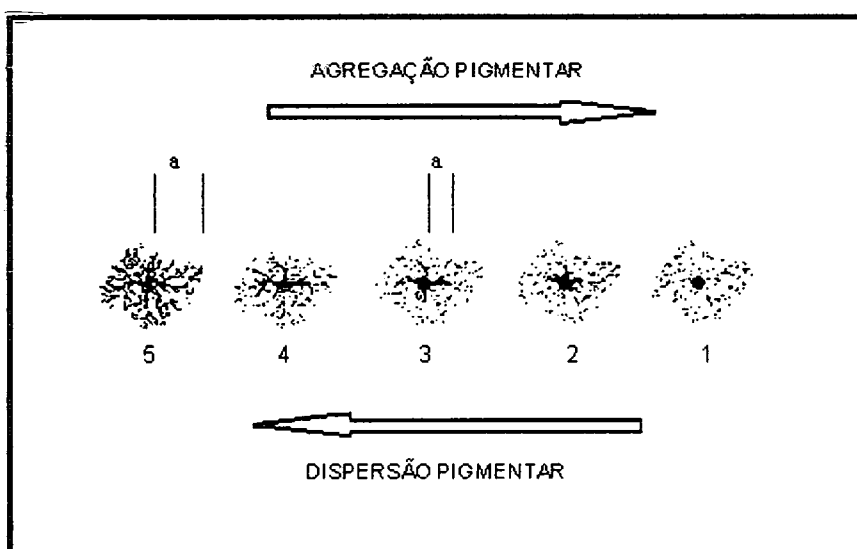


Fig. 01 - Representação esquemática da variação no comprimento aparente da projeção celular de cromatóforos de crustáceos durante a migração pigmentar: a - comprimento da projeção celular ocupado por grânulos. Os números representam o grau de migração dos pigmentos a partir da seguinte convenção: estágio 1, máxima agregação pigmentar; estágio 5, máxima dispersão pigmentar; e estágios 2, 3 e 4, condições intermediárias. Retirado de <http://www.octopus.furg.br/pesquisa/Projetos/cor.htm>.

1.3 *Chasmagnathus granulata*

É um caranguejo semi-terrestre de hábito alimentar onívoro, que ocorre ao longo da costa sul do Brasil, Uruguai e Argentina, nas regiões do meso e do supralitoral (BOTTO & IRIGOYEN, 1979) e forma densas populações construtoras de tocas sob as superfícies barrentas dos ambientes de marisma (GRECO & RODRIGUEZ, 1990). Por ser um animal estuarino, freqüentemente é exposto a variações de salinidade, apresentando boa capacidade de hiperregular, em baixas salinidades, suas concentrações osmótica e iônica hemolinfáticas (BROMBERG *et al.*, 1995; LUQUET *et al.*, 1992). Esta é ainda uma espécie amplamente utilizada como modelo experimental em outros tipos de estudos toxicológicos e fisiológicos (BIANCHINI & CASTILHO, 1999; MONSERRAT & BIANCHINI, 1995; SANTOS *et al.*, 1997) (Fig.02).

Fig.02: Foto de um *C. granulata* coletado em Rio Grande dia 24 de fevereiro de 2005.



Pereyra e col. (1996) reportaram que este crustáceo apresenta um ritmo circadiano de atividade locomotora, com pico na noite subjetiva. *C. granulata*

também apresenta variações diárias no consumo de oxigênio de brânquias e hepatopâncreas, tendo maior metabolismo no período noturno (MACIEL, 2003).

Granato e col. (2004) observaram que nesta espécie também ocorre um ritmo circadiano endógeno de migração pigmentar com a dispersão dos pigmentos nos cromatóforos ocorrendo na fase clara (dia subjetivo) e a agregação dos mesmos, na fase escura (noite subjetiva) e que este ritmo é dependente do pedúnculo ocular, pois não se mantém em caranguejos apedunculados mantidos sob condições ambientais constantes. *C. granulata* também apresenta dispersão pigmentar quando exposto a UVR (RIBEIRO, 2004) mesmo quando se realiza a ablação do pedúnculo ocular dos animais, sendo, portanto, neste caso, uma resposta independente do complexo órgão X - glândula do seio. Aparentemente a dispersão pigmentar diminui os danos celulares provocados pela UVR, pois os melanóforos com pigmentos agregados (animais apedunculados, ou antes, da exposição à UVR) apresentaram maior atividade de enzimas antioxidantes e danos no DNA do que os melanóforos com pigmentos dispersos (RIBEIRO, 2004).

Embora haja estudos mostrando que alguns crustáceos adaptam-se a diferentes cores de fundo (CASTRUCCI & MENDES, 1975; SILVA *et al.*, 2001), *C. granulata* não parece apresentar mudança de cor associada ao substrato (rápida e secundária), pois quando aclimatado a fundo branco ou preto não responde com agregação e dispersão pigmentar, respectivamente (Prof. Dr. Luiz Eduardo M. Nery – FURG – comunicação pessoal).

A partir dessas informações foi elaborado o projeto intitulado “Ritmos biológicos de mudança de cor fisiológica e atividade locomotora em caranguejos da espécie *Chasmagnathus granulata*: possíveis polimorfismos e suas bases genéticas, osciladores e sistemas de sinalização”. Este projeto objetiva compreender o relógio biológico da espécie *C. granulata* com ênfase na caracterização dos ritmos circadianos e possíveis polimorfismos, localização de osciladores e sistema de sinalização. Para tanto pretende-se (1) caracterizar a resposta dos ritmos de mudança de cor e atividade locomotora a partir de curvas de resposta de fase; (2) verificar o efeito de remoção do pedúnculo ocular dos animais na expressão dos possíveis polimorfismos rítmicos que venham a ser detectados na tentativa de caracterização de osciladores; (3) verificar o efeito da injeção de melatonina na expressão dos possíveis polimorfismos rítmicos, na tentativa de elucidar o sistema

de sinalização circadiano; (4) investigar as possíveis bases genéticas da expressão dos polimorfismos rítmicos citados.

No entanto como os exemplares de *C. granulata* foram retirados de seu ambiente natural e transportados da cidade de Rio Grande (RS) para Curitiba (PR) (Fig.03), fez-se necessária a repetição dos experimentos para caracterização do ritmo sincronizado e em livre curso de mudança de cor nestes animais, objetivo que deu origem a este projeto de monografia.

Assim a confirmação do ritmo de mudança de cor fisiológica em *C. granulata*, permitirá a realização do projeto citado acima para a caracterização do sistema de temporização desta espécie. Tanto a ritmicidade biológica em geral, como um ritmo de mudança de cor devem poder melhorar a sobrevivência do animal em seu ambiente, por adaptá-lo às variáveis ambientais também cíclicas, tais como fotoperíodo e temperatura. Além disso, a cor dos animais e suas alterações podem minimizar os danos da radiação UV ao DNA (RIBEIRO *et al.*, 2002; THURMAN, 1990), colaborar na termorregulação e na captura de presas ou na fuga de predadores (BAGNARA & HADLEY, 1973).

Em resumo como ambos os processos estudados aqui são importantes na sobrevivência dos animais em seu meio e como *C. granulata* é uma espécie chave nos ecossistemas de marisma da costa sul da América Latina e amplamente utilizado como modelo experimental, a realização deste estudo mostra-se efetivamente relevante.

Fig.03A: Região de marisma na qual os animais foram coletados. 3A vista geral.



Fig.03B: Detalhe do sedimento e de *C. granulata*.



2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi de caracterizar o ritmo (sincronizado e em livre curso) de mudança de cor fisiológica na espécie *C. granulata* submetida a diferentes regimes fotoperiódicos.

2.1. Objetivos Específicos

Caracterizar o ritmo de mudança de cor em animais submetidos aos seguintes regimes fotoperiódicos:

2.1.1 – 12 horas de luz / 12 horas de escuro (CE12:12);

2.1.2 – escuro constante (EE);

2.1.3 – luz constante (CC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e aclimação

Exemplares de *C. granulata* foram coletados nos marismas da Lagoa dos Patos, nos arredores da Cidade de Rio Grande/RS. Os animais foram adequadamente transportados para o Laboratório de Cronobiologia do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, onde ficaram aclimatados em monoblocos de plástico brancos, por cerca de 60 dias totais, a uma temperatura constante de 20°C, salinidade de 20 partes por mil, fotoperíodo fixo (CE12:12) e aeração constante. A fim de evitar possíveis efeitos dos ciclos reprodutores e de muda, utilizamos apenas machos adultos nos estágios C ou início do D, do ciclo de intermuda (DRACH & TCHERNIGOVTZEFF, 1967). Os animais foram alimentados com carne bovina moída *ad libitum*, 2 vezes por semana, em diferentes horários.

3.2 Registro do ritmo de mudança de cor de *C. granulata*

Foram mantidos 2 grupos de 6 exemplares machos de *C. granulata* em monoblocos plásticos de fundo branco (30x30x17cm), com aproximadamente 6 cm de água, permitindo que o animal ficasse levemente submerso.

Os animais foram mantidos em fotoperíodo CE12:12 durante 8 dias, quando foram marcados individualmente (com reduzida pincelada de esmalte aplicada na parte posterior do corpo) e a partir de então, ficaram por mais 7 dias nas condições fotoperiódicas experimentais citadas a seguir: (1) CE12:12; (2) EE; (3) CC. Embora os caranguejos possam ter sido repetidos em mais de uma condição experimental (por terem sido mantidos em monobloco comum no período entre os experimentos), no intervalo das condições experimentais eles foram submetidos por tempo suficiente a fotoperíodo CE12:12, de forma que é totalmente improvável que os resultados de um experimento tenham interferido com o seguinte. Mesmo porque a mudança de cor fisiológica observada é um processo reversível e rápido demorando apenas de segundos a horas.

Durante os últimos 3 dias nas condições 1, 2 ou 3, os animais foram submetidos, a cada 2 horas, à avaliação de seu estágio de agregação-dispersão pigmentar, segundo o índice de Hogben e Slome (1931). A região escolhida para observação no corpo do animal foi o meropodito do terceiro par de maxilípedes, visto

que nesta região o exoesqueleto é fino e translúcido, facilitando a observação (GRANATO *et al.*, 2004).

O horário de início das coletas foi, respectivamente, 7, 9 e 11 horas, para as condições 1, 2 e 3. Nas condições 1 e 2 as coletas foram feitas seguindo o regime da condição. No entanto, na condição 3, os animais pareciam menos saudáveis para o experimento, então durante o segundo dia de coleta foi preciso trocar a água em que os mesmos estavam sendo mantidos. Durante a fase de registro os animais não foram alimentados.

A observação dos maxilípedes dos animais foi feita em microscópio estereoscópico e, durante a fase de escuro, teve o auxílio de uma lâmpada infravermelha de 150W (modelo Infraphil Par 38E da Philips) que, no entanto, ficou permanentemente acesa. A intensidade luminosa foi de 3,5 lux durante a fase escura e de 150 lux durante a fase clara, segundo medidas efetuadas através de um luxímetro digital (Instrutherm LD200).

3.3 Análise estatística

Os dados dos registros do índice de migração pigmentar foram analisados pelo cosinor que determinou os valores de mesor, amplitude e acrofase dos ritmos (NELSON *et al.*, 1979). As comparações entre mesor, amplitude e acrofase foram realizadas com base nos intervalos de 95% de confiança ($p < 0,05$). Utilizou-se também o programa Plot, que ilustra, por diferença de cor, a condição de distribuição pigmentar em relação à hora do dia. As diferenças entre as médias foram comparadas através de análise de variância (ANOVA – “one-way”) e teste de contraste (Tukey), sendo os resultados considerados significativos para $p < 0,05$.

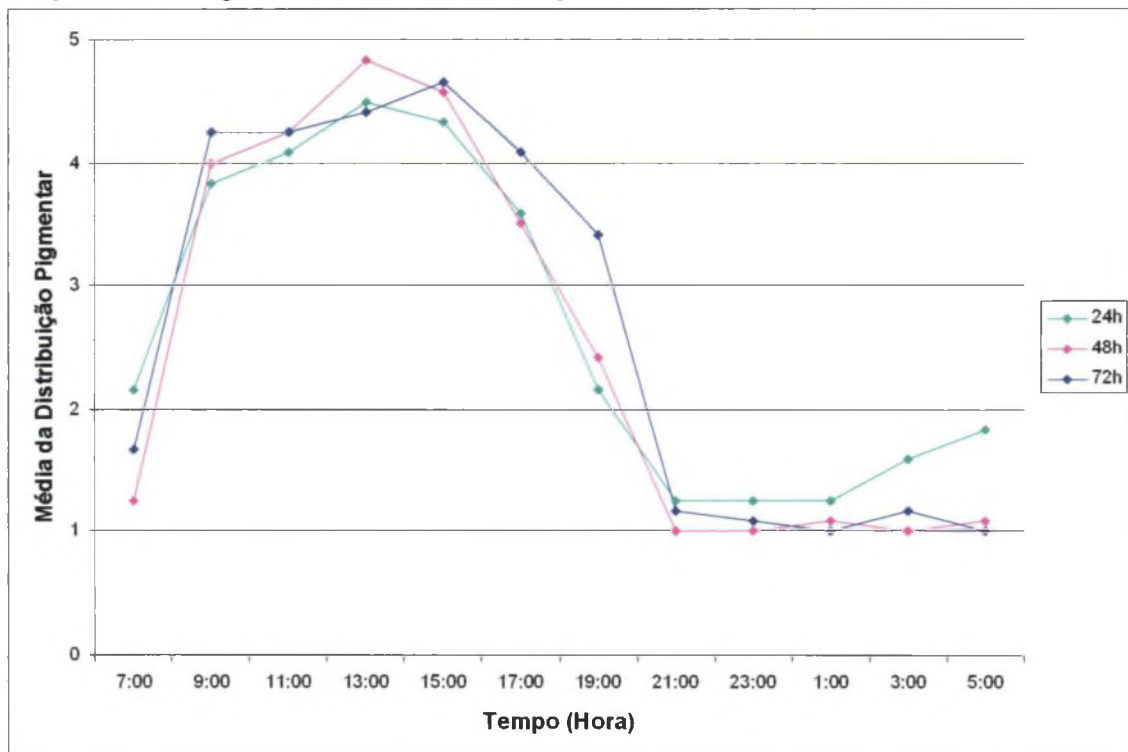
4. RESULTADOS

Após a aclimação de exemplares de *C. granulata* (n = 12) em fotoperíodos CE12:12, EE e CC obtiveram-se os valores referentes à distribuição dos pigmentos nos melanóforos, lembrando que a migração pigmentar representa a mudança de cor fisiológica dos animais. A partir dos valores de distribuição pigmentar foram calculados médias e respectivos desvios-padrão para cada horário de observação (a cada 2 horas em um total de 72 horas), as quais estão representadas nas tabelas/figuras 01/04 (CE12:12), 02/05 (EE) e 03/06 (CC).

Tab.01: Índice de distribuição dos pigmentos nos melanóforos de *C. granulata* mantidos em CE12:12 (n = 12).

Horário Dia	07:00	09:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	21:00	23:00	01:00	03:00	05:00
24h	2,17 ±1,11	3,83 ±1,40	4,08 ±1,31	4,50 ±1,17	4,33 ±1,37	3,58 ±1,24	2,17 ±0,94	1,25 ±0,45	1,25 ±0,45	1,25 ±0,45	1,58 ±0,79	1,83 ±0,83
48h	1,25 ±0,62	4,00 ±1,28	4,25 ±1,22	4,83 ±0,39	4,58 ±1,16	3,50 ±1,17	2,42 ±1,56	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,08 ±0,29	1,00 ±0,00	1,08 ±0,29
72h	1,67 ±0,98	4,25 ±1,36	4,25 ±1,56	4,42 ±1,24	4,67 ±0,89	4,08 ±1,51	3,42 ±1,44	1,17 ±0,39	1,08 ±0,29	1,00 ±0,00	1,17 ±0,39	1,00 ±0,00

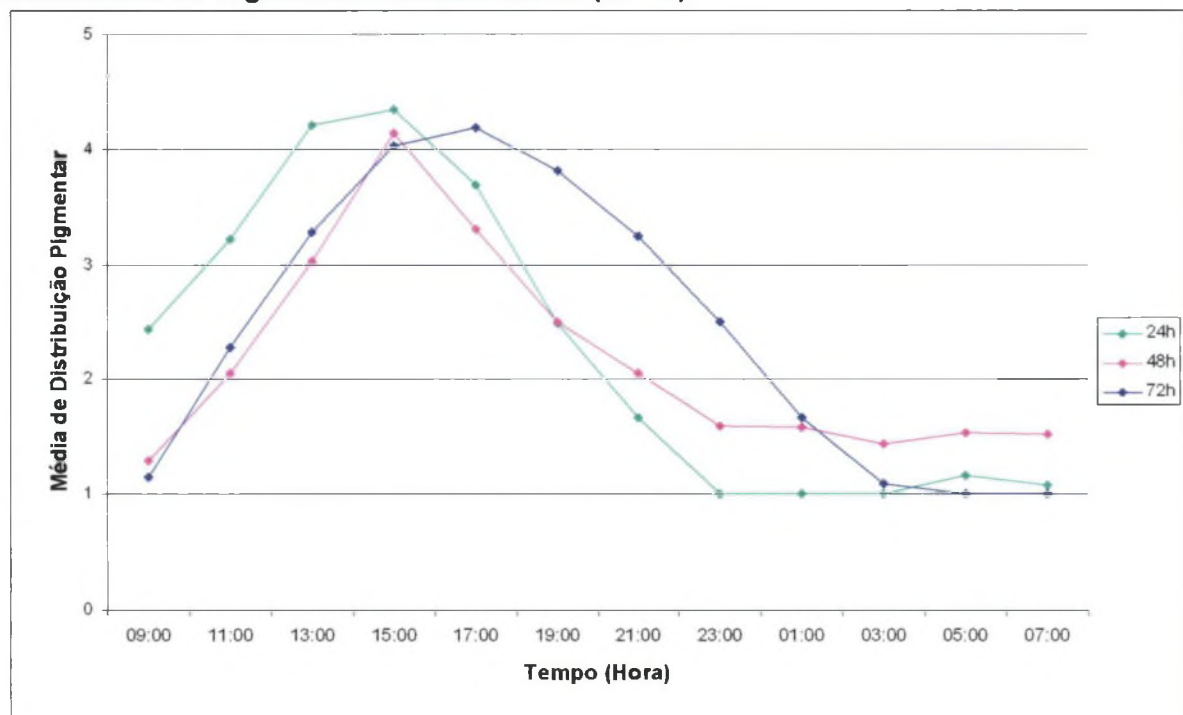
Fig.04: Gráfico representando a variação do grau de distribuição dos pigmentos nos melanóforos de *C. granulata* mantidos em CE12:12 (n = 12). Os erros padrões tanto nesta figura quanto nas Fig. 05 e 06, foram omitidos para melhor visualização das curvas.



Tab.02: Índice de distribuição dos pigmentos nos melanóforos de *C. granulata* mantidos em EE (n = 12).

Horário Dia	09:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	21:00	23:00	01:00	03:00	05:00	07:00
24h	2,44 ±1,81	3,23 ±1,79	4,21 ±1,36	4,35 ±0,96	3,69 ±1,48	2,49 ±1,61	1,67 ±0,95	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,15 ±0,38	1,07 ±0,28
48h	1,30 ±0,60	2,05 ±1,46	3,04 ±1,45	4,14 ±1,04	3,31 ±1,46	2,50 ±1,71	2,05 ±1,44	1,60 ±0,75	1,58 ±0,77	1,44 ±0,48	1,54 ±0,64	1,52 ±0,65
72h	1,14 ±0,55	2,29 ±1,60	3,29 ±1,70	4,04 ±1,19	4,19 ±1,36	3,82 ±1,28	3,25 ±1,49	2,50 ±1,51	1,67 ±0,95	1,08 ±0,28	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00

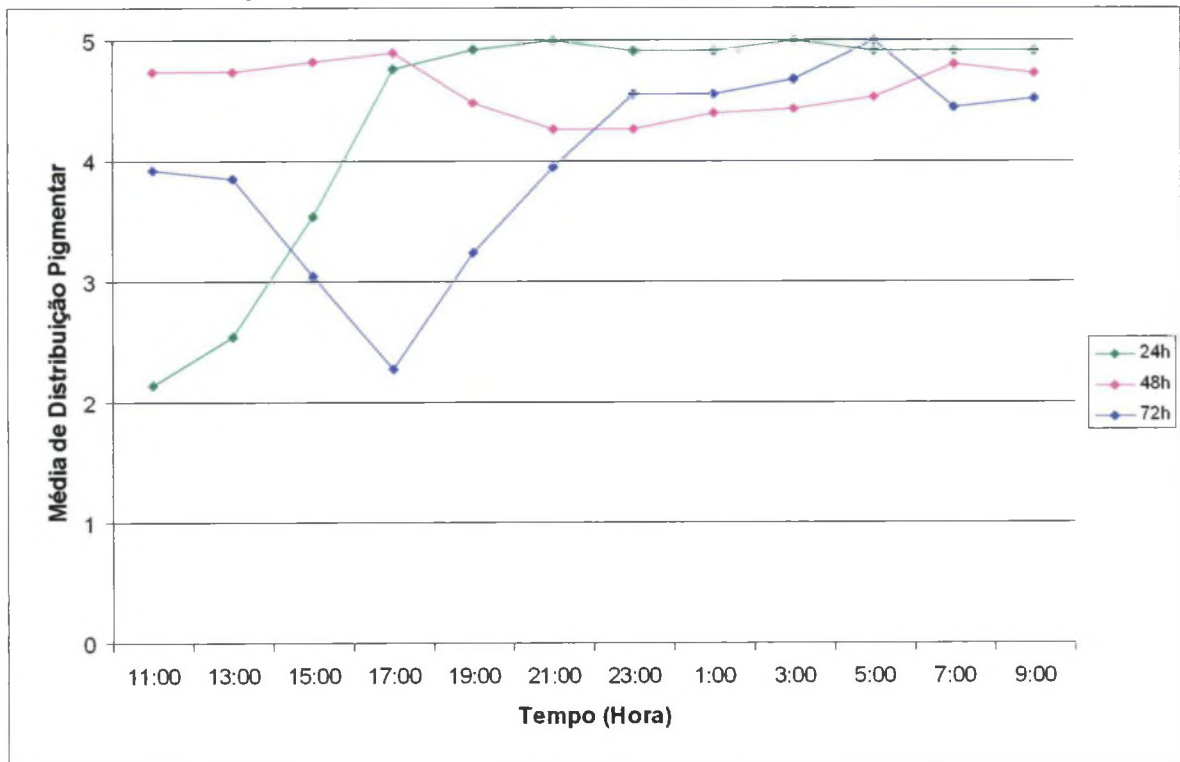
Fig.05: Gráfico representando a variação do grau de distribuição dos pigmentos nos melanóforos de *C. granulata* mantidos em EE (n = 12).



Tab.03: Índice de distribuição dos pigmentos nos melanóforos de *C. granulata* mantidos em CC (n = 12).

Horário Dia	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	21:00	23:00	01:00	03:00	05:00	07:00	09:00
24h	2,14 ±0,94	2,51 ±1,61	3,51 ±1,23	4,76 ±0,62	4,93 ±0,29	5,00 ±0,00	4,92 ±0,29	5,00 ±0,00	5,00 ±0,00	5,00 ±0,00	5,00 ±0,00	5,00 ±0,00
48h	5,00 ±0,00	5,00 ±0,00	5,00 ±0,00	4,90 ±0,29	4,49 ±0,80	4,27 ±0,87	4,27 ±0,87	4,40 ±0,98	4,44 ±0,90	4,54 ±0,67	4,80 ±0,58	4,73 ±0,45
72h	3,93 ±1,68	3,86 ±1,59	3,04 ±1,73	2,29 ±1,44	3,24 ±1,22	3,96 ±1,31	4,56 ±0,90	4,56 ±1,00	4,69 ±0,65	5,00 ±0,00	4,46 ±0,90	4,53 ±1,16

Fig.06: Gráfico representando a variação do grau de distribuição dos pigmentos nos melanóforos de *C. granulata* mantidos em CC (n = 12).



Durante as três condições fóticas do experimento ficou evidente a presença de ritmicidade circadiana na distribuição pigmentar ($p < 0,001$) (Tab.04) (Fig.07). Nas condições CE12:12 e EE houve o predomínio de dispersão pigmentar durante a fase de claro (subjativa e efetiva) e de agregação pigmentar durante a fase de escuro (subjativa e efetiva). Contudo na condição CC, embora na distribuição de pigmentos nos melanóforos continue existindo ritmicidade circadiana, há um predomínio maior do estágio de dispersão pigmentar em comparação às outras duas condições (CE12:12 e EE).

Tab.04: Valores descritos pelos parâmetros do cosinor: amplitude, mesor e acrofase (horas) para ritmicidade circadiana (24h)

Condição Fótica (n)	Amplitude	Mesor	Acrofase (h)	P
CE12:12 (12)	1,792	2,609	13,2	< 0,001*
EE (12)	1,563	2,296	15,8	< 0,001*
CC (12)	1,033	4,33	2,8	< 0,001*

* demonstram significância na ritmicidade circadiana

5. DISCUSSÃO

A distribuição de pigmentos nos cromatóforos de *Chasmagnathus granulata* exibiu ritmicidade circadiana, com predomínio do padrão em que os pigmentos estão dispersos durante o dia subjetivo e agregados durante a noite subjetiva. Assim esses animais apresentam um ritmo circadiano de mudança de cor fisiológica. Aparentemente a dispersão pigmentar diminui os danos celulares provocados pela UVR, pois os melanóforos com pigmentos agregados apresentam maior atividade de enzimas antioxidantes e danos no DNA do que os melanóforos com pigmentos dispersos (RIBEIRO *et al.*, 2002; 2004).

Muitos autores têm verificado que caranguejos do gênero *Uca* exibem um ritmo de mudança de cor fisiológica (BARNWELL, 1963; BROWN, 1950; BROWN *et al.*, 1953; HINES, 1954; THURMAN, 1988). No entanto, além desse gênero, foi descrita ritmicidade de mudança de cor em outras espécies dentre os braquiúros, tais como *Callinectes sapidus* (Fingerman, 1955), *Carcinus maenas* (Powell, 1962a,b, 1966) e *Cancer magister* (Shibley, 1968). A ritmicidade de distribuição pigmentar em *C. granulata* esteve presente sob todas as condições experimentais, podendo então ser reconhecida como uma resposta endógena do animal (mantida nas condições fotoperiódicas constantes EE e CC). De maneira geral, nossos resultados foram muito semelhantes aos já obtidos por Granato e col. (2004).

Nos resultados obtidos sob as condições CE12:12 e EE, o ritmo de distribuição pigmentar nos cromatóforos exibiu um mesor semelhante para as duas condições, ou seja, segundo a escala de Hogben e Slome (1931), os animais mantiveram um padrão intermediário de distribuição (agregação – dispersão) de aproximadamente 2,5. As acrofases nestas duas condições também se mantiveram semelhantes, sendo que o maior índice de distribuição pigmentar (estágio 5 – máxima dispersão) ocorreu, nas duas condições, no período da tarde (13h em CE12:12 e 15h em EE). Conforme já citado, sabendo que a dispersão pigmentar aumentaria a proteção do DNA contra a radiação UV (RIBEIRO *et al.*, 2002, 2004) e considerando-se que esses horários de acrofase estão no intervalo do dia em que, na natureza, haveria maior quantidade de radiação solar, esta característica do ritmo poderia ser uma adaptação evolutiva auxiliar na sobrevivência da espécie.

Apesar de *C. granulata* ser uma espécie com o pico de atividade locomotora noturno (PEREYRA *et al.*, 1996) isto não significa que o animal não apresente

atividade diurna, embora em menor grau, de modo que a dispersão pigmentar diurna continuaria sendo importante na proteção do DNA contra a radiação UV (RIBEIRO *et al.*, 2002, 2004).

A similaridade entre o ritmo biológico de mudança de cor fisiológica nas condições CE12:12 e EE é um resultado esperado. Isto porque os ritmos endógenos tendem a se manter nas condições ambientais constantes, com pequenas alterações na amplitude e período (representada pelo atraso de 2 horas na acrofase em EE) dos mesmos, uma vez que o agente sincronizador não os está arrastando. A redução da amplitude do ritmo em livre curso, por exemplo, já foi detectada na atividade circadiana da enzima N-acetil-transferase (a principal enzima na biossíntese de melanina) em pineal de galinha e no ritmo de mudança de cor de *Anolis carolinensis* (BINKLEY, 1988).

Já nos dados coletados durante a condição CC, houve um aumento do mesor, uma diminuição da amplitude, uma inversão da acrofase do ritmo e uma diferença significativa entre a média de distribuição pigmentar em comparação com as outras condições (CE12:12 e EE). O aumento do mesor indica que os animais mantiveram os pigmentos dispersos por um período maior do que os animais nas outras condições. A diminuição da amplitude e a irregularidade da curva sugerem que mesmo com a presença do ritmo, esse ritmo sofreu redução na sua evidência. A inversão do período em que houve o maior grau de dispersão do pigmento nos cromatóforos de *C. granulata* pode ter sido resultado de os animais apresentarem resposta primária (direta) à luz (GRANATO *et al.*, 2004), ou seja, quando esta é detectada por fotorreceptores extra-retinais (BAGNARA, 1965; BINKLEY, 1988; ROLLAG, 1988, NERY *et al.*, 2004) ou, menos provavelmente, de terem sido afetados devido à troca de água dos monoblocos (ver Materiais e Métodos). Isoldi e col. (2005), por exemplo, sugerem a presença de melanopsinas em melanóforos dérmicos de *Xenopus laevis*, os quais respondem diretamente à luz e Koyanagi e col. (2005) sugerem a presença de uma molécula homóloga de melanopsinas de vertebrados em cefalocordados; assim talvez possam ocorrer melanopsinas também em invertebrados.

Conforme os resultados demonstram, há uma razoável diferença na expressão do ritmo de mudança de cor fisiológica de *C. granulata* entre as condições CE12:12 e EE quando comparadas à condição CC. Inclusive, nesta

condição, há uma considerável redução dos desvios-padrão das médias de distribuição pigmentar em comparação às duas primeiras condições. Por ser uma condição ambiental constante, CC poderia permitir a expressão do ritmo em livre-curso de modo semelhante ao que foi obtido em EE. Contudo devido à provável ocorrência de uma resposta primária à luz (GRANATO *et al.*, 2004) induzindo dispersão pigmentar, o ritmo sob CC apresentou-se razoavelmente diferente do ritmo sob CE12:12 e EE. Ou seja, o estímulo luminoso seria preponderante à variação rítmica diária endógena na coloração dos animais. Isto parece novamente adaptativo à sobrevivência de *C. granulata* no ambiente, se mais uma vez ressaltar a importância da dispersão pigmentar na proteção do DNA contra a radiação UV (RIBEIRO *et al.*, 2002, 2004).

Alguns estudos tentaram verificar se essa ritmicidade circadiana de mudança de cor em cromatóforos de crustáceos seria intrínseca a esta célula ou dependente de osciladores localizados em outros tecidos. O ritmo de mudança de cor em crustáceos apresenta grandes possibilidades de regulação hormonal, uma vez que os cromatóforos de crustáceos não são inervados e os hormônios controlam a mudança de cor. Em algumas espécies, o ritmo citado foi mantido mesmo após ablação do pedúnculo ocular onde está o órgão X – glândula do seio, importante centro neuro-endócrino de crustáceos decápodes (KALMUS 1938a, b). Esse foi o caso dos estudos realizados com *Uca pugilator* (FINGERMAN, 1966) e *Lysmata seticulata* (CHASSARD-BOUCHAUD & COUTURIER, 1969). No entanto, em trabalhos com *Sphaeroma serratum* (DAGUERRE DE HUREAX, 1967; PIGEULT, 1958), *Palaemon serratus* (HUMBERT, 1965; PASTEUR, 1958) e em estudo prévio com *C. granulata* (GRANATO *et al.*, 2004) é sugerido que o ritmo de mudança de cor seja afetado pela retirada do pedúnculo ocular.

De acordo com os dados de literatura citados (GRANATO *et al.*, 2004), é muito provável que a ritmicidade circadiana de distribuição pigmentar em *C. granulata* esteja relacionada à ritmicidade na síntese ou na liberação de neurohormônios do complexo neuroendócrino órgão X - glândula do seio. Neste complexo já foram identificados dois peptídeos com ação sobre a mudança de cor em crustáceos: o hormônio dispersador de pigmento (PDH) e o hormônio concentrador de pigmento vermelho (RPCH) (NERY & CASTRUCCI, 1997). É através dos processos de agregação e dispersão pigmentar que se efetua a

mudança de cor fisiológica caracterizada neste trabalho. Assim, como esses peptídeos são os principais reguladores desse tipo de mudança de cor, seria esperado que a ausência dos mesmos no organismo, através da ablação do pedúnculo ocular, alterasse também a ritmicidade circadiana de mudança de cor fisiológica. No entanto não se pode descartar a possibilidade de mais um oscilador estar atuando sobre o ritmo de mudança de cor, o que estaria de acordo com a hipótese atualmente mais aceita de um sistema multioscilar de controle circadiano (MARQUES & MENNA-BARRETO, 2003).

Lembrando que alguns crustáceos adaptam-se a diferentes cores de fundo (CASTRUCCI & MENDES, 1975; SILVA *et al.*, 2001), é importante considerar que *C. granulata* parece não apresentar mudança de cor associada ao substrato (secundária), pois quando aclimatado a fundo branco ou preto, não responde com agregação e dispersão pigmentar, respectivamente (Prof. Dr. Luiz Eduardo M. Nery – FURG – comunicação pessoal).

A ritmicidade circadiana não é exclusivamente relacionada à mudança de cor, uma vez que existem vários outros ritmos biológicos em animais (MARQUES & MENNA-BARRETO, 2003) dentre eles os crustáceos e a espécie *C. granulata* (MACIEL, 2003; PEREYRA *et al.*, 1996). Além disso, é possível a ocorrência de ritmicidade circamaré. Ritmos de atividade circamaré já foram detectados, por exemplo, nos isópodes: (1) *Cirolana cookii* com um período em livre-curso de 12,4 horas; sendo sugerido, inclusive, que mais de um relógio possa controlar sua expressão (MEHTA e LEWIS, 2000); (2) *Dimorphostylis asiatica*, sendo neste caso o ritmo em questão sujeito aos ciclos ambientais de pressão hidrostática (AKIYAMA 2004). Em nossas análises preliminares não encontramos evidências de distribuição pigmentar em ritmos de aproximadamente 12 horas (circamaré).

Considerando que *C. granulata* é um animal detritívoro nos marismas da região, e como grande parte do fluxo energético que se move nos marismas flui através da cadeia alimentar detritívora, a espécie apresenta um importante papel no processo de aceleração de transferência energética neste ambiente (D'INCAO *et al.*, 1990). Assim, todas as informações relativas à biologia de *C. granulata* seriam relevantes ao se considerá-lo uma espécie-chave no ecossistema em questão. Além disso, *C. granulata* também é considerado um bom modelo para estudos sobre: (1) o efeito da radiação UV no tegumento e na coloração de crustáceos, incluindo o teste

da ocorrência de melanopsinas em seus cromatóforos; (2) o controle endócrino da mudança de cor; (3) os genes-relógio que interferem na expressão da ritmicidade biológica.

Este trabalho de conclusão de curso garantiu informações sobre o manejo e manutenção de *C. granulata* que serão importantes para o Laboratório de Cronobiologia e para o Laboratório de Fisiologia da Célula Pigmentar do Departamento de Fisiologia desta Universidade, uma vez que tais informações servirão para a realização de projeto já citado (em conjunto a esses dois laboratórios e à Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG) sobre “Ritmos biológicos de mudança de cor fisiológica e atividade locomotora em caranguejos da espécie *Chasmagnathus granulata*: possíveis polimorfismos e suas bases genéticas, osciladores e sistemas de sinalização”. A repetição dos resultados obtidos na FURG (Granato *et al.*, 2004) evidenciando um ritmo de mudança de cor fisiológica em *C. granulata* serve a partir daqui, como base para a realização de outros experimentos propostos neste projeto mais geral, que objetiva compreender o relógio biológico da espécie *C. granulata* com a caracterização de possíveis polimorfismos nos ritmos de mudança de cor, localização de osciladores (por exemplo, investigando qual seria o efetivo papel do órgão X – glândula do seio) e sistemas de sinalização circadiano (por exemplo, teste do efeito da melatonina sobre o ritmo).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFEICHE, S. C. Conceitos fundamentais da ritmicidade biológica. In: Cipolla-Neto, J.; Marques, N. & Menna-Barreto, L. S. **Introdução ao Estudo da Cronobiologia**. São Paulo. Ícone Editora, 1988. p. 34-50.
- AGAPITO, M. T.; HERRERO, B.; PABLOS, M. I.; MIGUEL, J. L.; RECIO, J. M. Circadian rhythms of melatonin and serotonin-N-acetyltransferase activity in *Procambarus clarkii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 112 (A), p. 179-185, 1995.
- AKIYAMA T. Entrainment of the circadian swimming activity rhythm in the cumacean *Dimorphostylis asatica* (Crustácea) to 12.5-hour hydrostatic pressure cycles. **Zoolog. Sci.**, v. 21, p. 29-38. 2004.
- BAGNARA, J. T.; HADLEY, M. E. **Chromatophores and Color Change**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 202p. 1973.
- BAGNARA, J. T. Cytology and cytophysiology of non-melanophore pigment cells. **Int. Rev. Citol.**, v. 29, p. 173-205. 1966.
- BAGNARA, J. T. Pineal regulation of body blanching in amphibian larvae. In: Kappers, J. A.; Schade, J. P. (Ed.). **Progress in Brain Research – Structure and Function of the Epiphysis Cerebri**. Amsterdam: Elsevier Publishing Company, v. 10, p. 489-504. 1965.
- BARNWELL, F. H. Observations on daily and tidal rhythms in some fiddler crabs from equatorial Brazil. **Biol. Bull.**, v. 125, p. 399-415. 1963.
- BALZER, I.; ESPÍNOLA, I. R.; FUENTES-PARDO, B. Daily variations of immunoreactive melatonin in the visual system of crayfish. **Biol. Cell.**, v. 89, p. 539-543. 1997.
- BIANCHINI, A.; CASTILHO, P. C. Effects of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na^+ , K^+ , ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851 (Decapoda-Grapsidae). **Bull. Environm. Contamin. Toxicol.**, v. 62, p. 63-69, 1999.
- BINKLEY, S. **The Pineal: Endocrine and Nonendocrine Function**, Prentice Hall, Englewood Cliffs, 304p. 1988.
- BLOCK, K. Chromosomal variation in *Agromyzidae* (Diptera). III. Cerodonta (*Butomomyza*) eucaricis Nowakowski--two semispecies or sibling species? **Hereditas**, v. 78, p. 125-40. 1974.
- BOTTO, J. L.; IRIGOYEN, H.R. Bioecología de la comunidad del cangrejal. I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) em la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. **Seminário sobre ecología bentónica y sedimentación de la plataforma continental del Atlántico Sur**. UNESCO, p. 161-169. 1979.

BROMBERG, E.; SANTOS, E.; BIANCHINI, A. Osmotic and ionic regulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) during hyposmotic stress. **Nauplius**, v. 3, p. 83-89. 1995.

BROWN, F. A. Jr; WEBB, H. M.; SANDEEN, M. I. Differential production of two retinal pigment hormones in palaemonetes by light flashes. **J. Cell Physiol.**, v. 41 (1), p. 123-144. 1953.

BROWN, F. A. Jr. Studies on the physiology of *Uca* red chromatophores. **Biol. Bull.**, v. 98 (3), p. 218-226. 1950.

BROWN, F. A. Jr. Color change in *Palaemonetes*. **J. Morphol.**, v. 57, p. 337-333. 1935.

CASTRUCCI, A. M. L.; MENDES, E. G. Ultrastructure of the pigmentary system and chromatophorotropic activity in land isopods. **Biol. Bull.**, v. 149, p. 467-479. 1975.

CHANDRASHEKARAN, M. K.; ENGELMANN, W. Early and late subjective night phases of the *Drosophila pseudoobscura* circadian rhythm require different energies of blue light for phase shifting. **Z Naturforsch [C]**, v. 28 (11), p. 750-753. 1973.

CHASSARD-BOUCHAUD, C.; COUTURIER, Y. Étude des phénomènes chromatiques de *Lysmata seticaudata* Risso (Crustacé – Decapode). II Effets de l'ablation des pedoncoles oculaires sur le cycle nyctheméral. **Cah. Biol. Mar.**, v. 10, p. 173-180. 1969.

CHRISTENSEN, N. D.; LEWIS, R. D. The circadian locomotor rhythm of *Hemideina thoracica* (Orthoptera; Stenopelmatidae): a population of weakly coupled feedback oscillators as a model of the underlying pacemaker. **Biol. Cybern.**, v. 47 (3), p. 165-172. 1983.

DAGUERRE DE HUREAX, N. Etude expérimentale du rôle de l'organe de bellonci et du lobe optique sur le comportement chromatique et la mue de *Sphaeroma serratum*. Incidence des ablations sur son comportement sexuel. **Bull. Soc. Sci. Nat. Maroc.**, v. 47, p. 33-115. 1967.

D'INCAO F., RUFFINO M. L., SILVA K. G., BRAGA A.C. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 161, p. 179-188. 1992.

D'INCAO F., SILVA K. G., RUFFINO M. L., BRAGA A.C. Hábito alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na Barra do Rio Grande, RS (Decápoda, Grapsidae). **Atlântica**, v. 12, p. 85-93. 1990.

DRACH, P.; TCHERNIGOVTZEFF, M. Sur la méthode de détermination des estades d'intermue et son application générale aux crustacés. **Vie Millieu**, v. 18, p. 595-607. 1967.

FERNLUND, P. Structure of a light-adapting hormone from the shrimp *Pandalus borealis*. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 439, p. 19-25. 1976.

FERNLUND, P.; JOSEFSSON, L. Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. **Science**, v. 177, p. 173-175. 1972.

FINGERMAN, M. Behavior of chromatophores of the fiddler crab *Uca pugilator* and the dwarf crayfish *Cambarellus shufeldti* in response to synthetic *Pandalus* red pigment-concentrating hormone. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 20, p. 589-592. 1973.

FINGERMAN, M. Comparative physiology: chromatophores. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 32, p. 345-372. 1970.

FINGERMAN, M. Persistent daily and tidal rhythms of color change in *Callinectes sapidus*. **Biol. Bull.**, v. 109, p. 255-264. 1955.

FUJII, R.; OSHIMA, N. Control of chromatophore movements in teleost fishes. **Zool. Sci.**, v. 3, p. 13-47. 1986.

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE. Departamento de Fisiologia Comparada. **Regulação Endócrina da Mudança de Cor Fisiológica em Crustáceos Braquiúros**. Disponível em: < <http://www.octopus.furg.br/pesquisa/Projetos/cor.htm> > Acesso em: 02 dez. 2005.

GÄDE, G. The adipokinetic hormone/red pigment concentrating hormone peptide family: structure, interrelationship and functions. **J. Insect Physiol.**, v. 36, p. 1-12. 1990.

GHIDALIA, W. Structural and biological aspects of pigments. In: Bliss, D.; Mantel L. H. (Ed.). **The Biology of Crustacean**. New York: Acad. Press Inc, 1985. p. 301-394.

GRANATO, F. C.; TIRONI, T. S.; MACIEL, F. E.; ROSA, C. E.; VARGAS, M. A.; NERY, L. E. M. Circadian rhythm of pigment migration induced by chromatophorotropins in melanophores of the crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 138 (A), p. 313-319. 2004.

GRECO, L. S. L.; RODRIGUEZ, E. M. Annual reproduction and growth of adult crabs *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). **Cah. Biol. Mar.**, v. 40 (2), p. 155-164. 1990.

HINES, M. N. Atidal rhythm in behaviour of melanophores in automatized legs of *Uca pugnax*. **Biol. Bull.**, v. 107, p. 386-396. 1954.

HOGBEN, L.; SLOME, D. The pigmentary effector system: IV. The dual character of endocrine co-ordination in amphibian color change. **Proc. R. Soc. Lond.**, v. 108 (B), p. 10-53. 1931.

HUMBERT C. Etude experimentale du role de l'organe X (Pars distalis) dans les changements de couleur et la mue de la crevette *Palaemon serratus*. **Trav. Inst. Sci. Chentien. Ser. Zool.**, v. 32, p. 1-86. 1965.

ILLNEROVÁ, H. Mammalian circadian clock and its resetting. **New Physiol. Sci.**, v. 6, p. 129-134. 1991.

ISOLDI, M. C.; ROLLAG, M. D.; CASTRUCCI, A. M.; PROVENCIO, I. Rhabdomeric phototransduction initiated by the vertebrate photopigment melanopsin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 25: 102 (4), p. 1217-1221. 2005.

JOSEFSSON, L. Structure and function of crustacean chromatophorotropins. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 25 (2), p. 199-202. 1975.

KALMUS, H. Über einen latenten physiologischen Farbwechsel beim Flusskrebse, *Potamobius astactus* sowie hormonale Beeinflussung. **Z. Vgl. Physiol.**, v. 25, p. 784-797. 1938a.

KALMUS, H. Das Aktogramm des Flusskrebse und seine Beeinflussung durch Organextrakte. **Z. Vgl. Physiol.**, v. 25, p. 798-802. 1938b.

KOLLWE, G. Über chromatophoren-system, farbensin und farbwechsel bei *Crangon vulgaris*. **Z. Vgl. Physiol.**, v. 5, p. 191-246. 1927.

KOYANAGI, M.; KUBOKAWA, K.; TSUKAMOTO, H.; SHICHIDA, Y.; TERAKITA A. Cephalochordate Melanopsin: Evolutionary Linkage between Invertebrate Visual Cells and Vertebrate Photosensitive Retinal Ganglion Cells. **Current Biology**, v. 15, p. 1065–1069. 2005.

LUQUET, C. M.; FORD, P.; RODRIGUEZ, E.; ANSALDO, M.; STELLA, V. Ionic regulation patterns in two species of estuarine crabs. **Comunic. Biol.**, v. 10, p. 315-325. 1992.

MACIEL, F. E. **Variação diária no consumo de oxigênio, sistema de defesa antioxidante e lipoperoxidação nas brânquias e hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae)**. Rio Grande, 2003. 23 f. Monografia de conclusão do curso de graduação em Oceanologia – Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L.. **Cronobiologia: conceitos e aplicações**, 3. ed. São Paulo: EDUSP. 2003.

METHA, T. B.; LEWIS, R. D. Quantative tests of a dual circalunidian clock model for tidal rhythmicity in the sand beach isopod *Cirolana cookii*. **Chronobiol. Int.**, v. 17 (1), p. 29-41. 2000.

MONSERRAT, J.; BIANCHINI, A. Effects of temperature and salinity on the toxicity of a commercial formulation of methyl parathion to *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28 (1), p. 74-78. 1995.

NELSON, W.; TONG, Y. L.; LEE, J. K.; HALBERG, F. Methods for cosinor-rhythmometry. **Chronobiol.**, v. 6, p. 305-323. 1979.

NERY, L. E. M. **Regulação endócrina e sinalização intracelular da mudança de cor fisiológica do camarão de água doce *Macrobrachium potiuana* (Crustácea – Decapoda)**. São Paulo, 1999. 88 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

NERY, L. E. M.; SILVA, M. A.; CASTRUCCI, A. M. L. Possible role of non-classical chromatophorotropins on the regulation of crustacean erythrophore. **J. Exp. Zool.**, v. 284, p. 711-716. 1999.

NERY, L. E. M.; SILVA, M. A.; CASTRUCCI, A. M. L. Pigment cell signaling for physiological color change: a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A (4), p. 1135-1144. 1997.

PASTEUR, C. Influence de l'ablation de l'organe X sur le comportement chromatique de *Leander serratus* (Pennant). **C. R. Hedb. Seances Acad. Sci. Parts.**, v. 246, p. 320-322. 1958.

PEREYRA, P.; DE LA IGLESIA, H. O.; MALDONADO, H. Training-to-testing intervals different from 24 h impair habituation in the crab *Chasmagnathus*. **Physiol. Behavior**, v. 59, p. 19-25. 1996.

PIGEAUT, N. L'organe de bellonci et le comportement chromatique de *Sphaeromae serratum*. **C. R. Hedb. Seances Acad. Sci. Parts.**, v. 246, p. 487-489. 1958.

POWELL, B. L. The control of the 24 hour rhythm of color change in juvenile *Carcinus maenas*. **Proc. R. Ir. Acad.**, v. B64, p. 379-399. 1966.

POWELL, B. L. Chromatophorotropins in the central nervous system of *Carcinus maenas*. **Crustaceana**, v. 4, p. 143-150. 1962a.

POWELL, B. L. Types, distribution and rhythmical behaviour of the chromatophores of juvenile *Carcinus maenas*. **J. Anim. Ecol.**, v. 31, p. 251-261. 1962b.

RAO, K. R.; RIEHM, J. P.; ZAHNOW, C. A.; KLEINHOLTZ, Z. H.; TARR, G. E.; JOHNSON, L.; NORTON, S.; LANDAU, M.; SEMMES, O. J.; SATTELBERG, R. M.; JORENBY, W. H.; HINTZ, F. Characterization of a pigment dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82 (16), p. 5319-5322. 1985.

RAO, K. R.; HACKETT, R. B. Studies on the physiological specificity of a synthetic crustacean chromatophorotropin. **Am. Zool.**, v. 13, p. 1276. 1973.

RIBEIRO G. **Efeitos da radiação ultravioleta na migração pigmentar em cromatóforos de crustáceos**. Rio Grande, 2004. 34 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Animal Comparada) – Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

RIBEIRO, G. R.; LOPES, T. M.; NERY, L. E. M.; TRINDADE, G. S. Efeitos da Radiação Ultravioleta na mudança de cor fisiológica em *Chasmagnathus granulata* e *Palaemonetes argentinus*. **XVII Reunião Anual da FeSbe**. Salvador, BA. Livro de Resumos, p. 97. 2002.

ROBINSON, W. G. Jr.; CARLTON, J. S. Microtubules, microfilaments and pigment granulate movement in the chromatophores of *Palaemonetes vulgaris* (crustacea). **Exp. Zool.**, v. 186, p. 279-304. 1973.

ROLLAG, M. D. Response of amphibian melanophores to melatonin. **Pineal Res. Rev.**, v. 6, p. 67-93. 1988.

SANTOS, E. A.; NERY, L. E. M.; KELLER, R. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. **Physiol. Zool.**, v. 70 (4), p. 415-420. 1997.

SHIBLEY, G. A. Eyestalk function in chromatophore control in a crab *Cancer magister*. **Physiol. Zool.**, v. 41, p. 268-279. 1968.

SILVA, M. A. S.; VISCONTI, M. A.; NERY, L. E. M.; CASTRUCCI, A. M. L. Efeito da temperatura na mudança de cor fisiológica de *Ligia exótica*. **Reunião Anual da FeSbe**. Caxambu, MG. Livro de Resumos, p. 308. 2001.

SKORKOWSKI, E. F.; BIEGNIIEWSKA, A. Neurohormones and control of physiological processes in Crustacea. **Adv. Physiol. Sci.**, v. 23, p. 419-432. 1981.

STANGIER, J.; HILBICH, C.; BEYREUTHER, K.; KELLER, R. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84 (2), p. 573-579. 1987.

TAKAHASHI, J. S.; MENAKER, M. Role of the suprachiasmatic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. **J Neurosci.**, v. 2 (6), p. 815-828. 1982.

THURMAN, C. L. Adaptative coloration in Texas fiddler crabs (*Uca*). In: Wicksten, M. (Ed.). **Adaptative Coloration in invertebrates: Anim. Behavior**. Texas A&M University Press, 1990. p. 109-125.

THURMAN, C. L. Rhythmic physiological color change in crustacean: a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. C91, p. 171-185. 1988.

TILDEN, A. R.; RASMUSSEN, P.; AWANTANG, R. M.; FURLAN, S.; GOLDSTEIN, J.; PALSGROVE, M.; SAUER, A. Melatonin cycle in the fiddler crab *Uca pugilator* and influence of melatonin on limb regeneration. **J. Pineal. Res.**, v. 23, p. 142-147. 1997.

TUMA, M. C. B.; CASTRUCCI, A. M. L.; JOSEFSSON, L. Comparative activities of the chromatophorotropins RPCH, α -PDH, and β -PDH on three crustacean species. **Physiol. Zool.**, v. 66 (2), p. 181-192. 1993.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Laboratório de Fisiologia Comparativa da Pigmentação. **Introdução a Pigmentação**. Disponível em: <<http://fisio.ib.usp.br/labpig/topicos.htm>> Acesso em: 02 dez. 2005.

VIVIEN-ROELS, B.; PEVET, P. Is melatonin an evolutionary conservative molecule involved in the transduction of photoperiodic information in all living organism? **Adv. Pineal Res.**, v. 1, p. 61-68. 1986.

WEVER, R. Autonomous circadian rhythms in man. Singly versus collectively isolated subjects. **Naturwissenschaften**, v. 62 (9), p. 443-444. 1975.

WELSH, J. H. The sinus gland and 24 hours cycle of retinal pigment migration in the crayfish. **J. Exp. Zool.**, v. 86, p. 35-49. 1941.

WELSH, J. H. The action of eyestalk extracts on retinal pigment migration in the crayfish *Cambarus bartoni*. **Woods Hole**, v. 77, p. 119-128. 1939.

WITHYACHUMNARNKUL, B.; PONGTIPPATEE, P.; AJPRU, S. N-acetyltransferase, hydroxyindole-O-methyltransferase and melatonin in the optic lobes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **J. Pineal Res.**, v. 18, p. 217-221. 1995.

WITHYACHUMNARNKUL, B.; BUPPANIROJ, K.; PONGSA-ASAWAPAIBOON, A. N-acetyltransferase and melatonin levels in the optic lobe of giant freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 102 (A), p. 703-707. 1992a.

WITHYACHUMNARNKUL, B.; PONGSA-ASAWAPAIBOON, A.; AJPRU, S.; SIAMWALLA, P.; TRAKULRUNGSI, W.; SAMRITTHONG, C. Continuous light increases N-acetyltransferase activity in the optic lobe of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man (Cruatacea: Decapoda). **Life Sci.**, v. 51, p. 1479-1484. 1992b.