

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO CARANGUEJO
CHASMAGNATHUS GRANULATA: EFEITO DO JEJUM E DA
REALIMENTAÇÃO E DA APEDUNCULAÇÃO SOBRE A
ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE HIPOSMÓTICO**

ANAPAULA SOMMER VINAGRE

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA

Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Porto Alegre, Dezembro de 1999.

Ao meu filho, Pedro, que deu um novo sentido à minha vida e

ao Luiz, sempre companheiro

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Roselis Silveira Martins da Silva, por todos esses anos de convivência e ensinamentos, que muito contribuíram para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.
- Aos meus familiares, e especialmente à minha mãe, Suzana, e às "tias" Luísa e Míriam, pelo grande apoio e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.
- À Dra. Isabel Cristina da Costa Rossi, pela inestimável amizade.
- À futura bióloga Clarissa Capp, pela ajuda fundamental na fase final deste projeto.
- Ao Dr. Luiz Carlos R. Kucharski, pela amizade, pelas sugestões valorosas e pelo auxílio nas situações de emergência.
- À Dra. Güendalina Turcatto Oliveira, pela amizade, pelas valiosas sugestões e pela ajuda com a cromatografia.
- Às amigas Alice e Rita, pelo carinhoso e indispensável auxílio técnico. e à Míriam, pela ajuda durante todo o desenvolvimento do Curso.
- Às biólogas Márcia Trapp, Ana Lúcia Chittó, Paula Eichler e Vanessa Schein; ao Dr. Edison Capp e aos demais colegas de laboratório, pela grande amizade e companheirismo.

- *Ao Dr. Pierre Devos, chefe do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Comparadas da "Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix" e à grande amiga e colega Dra. Suzanne Loret, pelos seus ensinamentos e pela recepção acolhedora em Namur, na Bélgica.*
- *Aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Fisiologia e aos demais Professores e Funcionários do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela amizade e convivência sempre agradável.*
- *Ao Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, pela utilização do Osmômetro do Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre*
- *Ao CNPq pela bolsa de doutorado e a FAPERGS e FINEP pelo auxílio financeiro.*

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS.....	08
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	17
INTRODUÇÃO.....	21
OBJETIVOS.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
1. Coleta e manutenção dos animais.....	47
2. Procedimentos experimentais.....	48
2. A. Efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de carboidratos, de proteínas e de lipídeos totais.....	48
2. A. a Estudo <i>in vivo</i>	48
2.A. b. Estudo <i>in vitro</i>	49
2.B. Efeito da ablação bilateral do pedúnculo ocular sobre a adaptação ao estresse hiposmótico.....	51
2. B. a Procedimento cirúrgico.....	52
2. C. Incubação dos pedúnculos oculares.....	52
2.D.Administração de bioaminas.....	54
2.D.a Serotonina.....	54
2.D.b Dopamina.....	54
3. Determinações bioquímicas.....	55
3. a. Determinação da glicose hemolinfática.....	55
3. b. Determinação de glicose livre nos tecidos.....	55

B.b.1. Síntese de glicogênio-C ¹⁴	69
B.b.2. Conversão do ¹⁴ C da glicina em glicose-C ¹⁴	71
II. EFEITO DA ABLAÇÃO DO PEDÚNCULO OCULAR SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DURANTE O PROCESSO DE ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE	73
1. Concentração de glicose na hemolinfa	73
2.a. Concentração de glicogênio no hepatopâncreas	76
2.b. Concentração de glicose livre no hepatopâncreas	78
3.a. Concentração de glicogênio no músculo	80
3.b. Concentração de glicose livre no músculo	82
4.a. Concentração de glicogênio nas brânquias anteriores	84
4.b. Concentração de glicose livre nas brânquias anteriores	86
5.a. Concentração de glicogênio nas brânquias posteriores	88
5.b. Concentração de glicose livre nas brânquias posteriores	90
III EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO DOS PEDÚNCULOS OCULARES SOBRE A GLICOSE HEMOLINFÁTICA DE CARANGUEJOS MANTIDOS COM AS DIETAS RC OU RP	92
IV EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MONOAMINAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE HEMOLINFÁTICA E A POSTURA DE ANIMAIS INTACTOS OU APEDUNCULADOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS RC OU RP	96
A. Efeitos da administração de serotonina	96
B. Efeitos da administração de dopamina	101
DISCUSSÃO.....	106

I. EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE A SÍNTESE DE CARBOIDRATOS, DE LIPÍDEOS TOTAIS E DE PROTEÍNAS	107
II. EFEITO DA ABLAÇÃO DO PEDÚNCULO OCULAR SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DURANTE O PROCESSO DE ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE.	114
III EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO DOS PEDÚNCULOS OCULARES SOBRE A GLICOSE HEMOLINFÁTICA DE CARANGUEJOS MANTIDOS COM AS DIETAS RC OU RP	124
IV EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MONOAMINAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE HEMOLINFÁTICA E A POSTURA DE ANIMAIS INTACTOS OU APEDUNCULADOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS RC OU RP	127
CONCLUSÕES	131
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	134

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS

- **Tabela 1:** Composição das dietas administradas ao caranguejo *Chasmagnathus granulata*48
- **Tabela 2:** Níveis de glicose hemolinfática e de glicose livre e glicogênio no hepatopâncreas, brânquias e músculo de caranguejos alimentados com a dieta RP intactos e apedunculados 7 e 15 dias após a cirurgia.52
- **Tabela 3 :** Comparação entre os valores de osmolaridade da hemolinfa de 5 exemplares de *Chasmagnathus granulata* mantidos na condição padrão de nosso laboratório com a osmolaridade das soluções salinas utilizadas nos experimentos.....53
- **Figura 1:** Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a incorporação do C¹⁴ da glicina em glicogênio *in vitro* no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados, em jejum e realimentados50
- **Figura 2:** radioatividade total na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata in vivo* alimentados, em jejum e realimentados 1 e 4 h após a administração de glicose-U-C¹⁴61
- **Figura 3.:** Concentração de glicose na hemolinfa *in vivo* antes do experimento e 4h após a administração de glicose-U-¹⁴C em *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas...62
- **Figura 4:** Incorporação do C¹⁴ da glicose em glicogênio *in vivo* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas.....63

- **Figura 5.** Incorporação de glicose-U-C¹⁴ em lipídeos totais *in vivo* no hepatopâncreas (A) e no músculo (B) de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas...65
- **Figura 6:** radioatividade total na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata in vivo* alimentados, em jejum e realimentados 1 e 4 h após a administração de glicina-U-C¹⁴66
- **Figura 7:** Incorporação do C¹⁴ da glicina em glicogênio *in vivo* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas.....67
- **Figura 8:** Incorporação do C¹⁴ da glicina em proteínas *in vivo* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas.....68
- **Figura 9:** Incorporação do C¹⁴ da glicose em glicogênio *in vitro* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas.....70
- **Figura 10:** Incorporação do C¹⁴ da glicina em glicogênio *in vitro* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas.....71
- **Figura 11:** Incorporação do C¹⁴ da glicina em glicose *in vitro* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas.....72
- **Figura 12:** Níveis de glicose na hemolinfa ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....75

- **Figura 13:** Níveis de glicogênio no hepatopâncreas ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B)...77
- **Figura 14:** Níveis de glicose livre no hepatopâncreas ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....79
- **Figura 15:** Níveis de glicogênio no músculo ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....81
- **Figura 16:** Níveis de glicose livre no músculo ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....83
- **Figura 17:** Níveis de glicogênio nas brânquias anteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....85
- **Figura 18:** Níveis de glicose livre nas brânquias anteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....87
- **Figura 19:** Níveis de glicogênio nas brânquias posteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....89
- **Figura 20:** Níveis de glicose livre nas brânquias posteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B).....91
- **Figura 21:** Concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos e apedunculados alimentados com dieta RC antes e após a injeção de salina normal (SN) e meio resultante da incubação de 4 pedúnculos frescos em salina (M4P).93

- **Figura 22:** Concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com dieta RP antes e após a injeção de solução salina (SN) e meio resultante da incubação de 4 (M4P), 8 (M8P) ou 12 (M12P) pedúnculos frescos em salina..94
- **Figura 23:** Concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com dieta RP antes e após a injeção de solução salina (SN) e meio resultante da incubação de 4 (M4P), 8 (M8P) ou 12 (M12P) pedúnculos em salina. ...95
- **Figura 24:** Efeito de diferentes doses de serotonina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RC.97
- **Figura 25:** Efeito da administração de solução salina e de serotonina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com a dieta RC.98
- **Figura 26:** Efeito de diferentes doses de serotonina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RP.99
- **Figura 27:** Efeito da administração de solução salina e de serotonina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com a dieta RP.100
- **Figura 28:** Efeito da injeção de serotonina ($2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo) sobre a postura do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, 5 (A) e 120 minutos (B) após a administração.....101
- **Figura 29:** Efeito de diferentes doses de dopamina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RC.....102
- **Figura 30:** Efeito de diferentes doses de dopamina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RP.....103

- **Figura 31:** Efeito da dopamina ($5,3 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo) sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com as dietas RP e RC.104
- **Figura 32:** Postura do caranguejo *Chasmagnathus granulata* 30 minutos após a injeção de dopamina ($5,3 \times 10^{-7}$ moles/ caranguejo).....105
- **Figura 33:** Postura do caranguejo *Chasmagnathus granulata* 60 minutos após a injeção de $5,3 \times 10^{-7}$ moles/ caranguejo de dopamina (A) e $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo serotonina (B).105

RESUMO

RESUMO

Com o objetivo de estudar o efeito do jejum e da realimentação sobre os processos de síntese de glicogênio, lipídeos totais e proteínas totais, foram administradas injeções de glicose-U-C¹⁴ e glicina-U-C¹⁴ em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com a dieta rica em proteínas (RP). Após a injeção de glicose-U-C¹⁴, foram medidos: a radioatividade total e os níveis de glicose na hemolinfa; a formação de glicogênio-C¹⁴ no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo (quelípede) e a síntese de lipídeos totais-C¹⁴ no hepatopâncreas e no músculo. Após a administração de glicina-U-C¹⁴, foram determinadas a radioatividade total na hemolinfa; a formação de glicogênio-C¹⁴ e de proteínas totais-C¹⁴ no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo.

A capacidade intrínseca de síntese de glicogênio e de glicose dos tecidos foi também estudada, *in vitro*, utilizando-se glicose-C¹⁴ ou glicina-C¹⁴ como precursores.

In vitro a síntese de glicogênio a partir de glicose-C¹⁴ não foi afetada pelo jejum nem tampouco pela realimentação em nenhum dos tecidos estudados. *In vivo*, somente verifica-se uma redução da capacidade de síntese de glicogênio, após a injeção de glicose-C¹⁴, nas brânquias dos animais realimentados. No hepatopâncreas de caranguejos alimentados foi verificada uma elevada capacidade de síntese de lipídeos totais a partir de glicose-C¹⁴, que não foi alterada pelo jejum e que aumentou significativamente durante a realimentação. Esta alta atividade lipogênica, aliada a alta concentração de lipídeos hepatopancreática, previamente observada neste caranguejo (Kucharski e Da Silva, 1991 A e B; Vinagre e Da Silva, 1992) sugerem que durante o processo de realimentação, o C¹⁴ da glicose seria desviado da síntese de glicogênio para a síntese de lipídeos.

Após a administração de glicina-C¹⁴, observa-se no tecido muscular uma diminuição da síntese de glicogênio no jejum e de síntese de proteínas na realimentação. Nas brânquias e no hepatopâncreas o jejum e a realimentação não afetaram a capacidade de síntese de

glicogênio e de proteínas totais a partir de glicina-C¹⁴. A capacidade de síntese de glicogênio-C¹⁴ a partir de glicina-C¹⁴, *in vitro*, não foi alterada pelo jejum ou pela realimentação em nenhum dos tecidos estudados. A capacidade de conversão do C¹⁴ da glicina em glicose no músculo, aumentou significativamente durante a realimentação. Esses resultados sugerem que durante a restrição alimentar, a glicose proveniente da gliconeogênese muscular seria utilizada como substrato energético por esses animais.

O efeito da remoção dos pedúnculos oculares sobre o metabolismo de carboidratos durante 6 dias de estresse hiposmótico (água destilada) foi estudado em animais alimentados com as dietas rica em proteínas (RP) ou rica em carboidratos (RC). Nesses experimentos, os pedúnculos oculares foram cirurgicamente removidos dois dias antes do início do estresse. Foram analisados os níveis de glicose circulante e de glicose livre e glicogênio no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo.

Dois dias após a remoção dos pedúnculos oculares, a concentração de glicose hemolinfática diminuiu 30% nos animais RP e 60% nos RC em comparação aos níveis pré-operatórios. Nesse momento, somente foram verificadas diferenças nos níveis de glicose livre nas brânquias anteriores de animais apedunculados RP com valores aumentados ($p < 0,05$) em relação aos caranguejos intactos. Ao longo do estresse hiposmótico, foi observado um padrão diferencial do metabolismo de carboidratos relacionado à composição da dieta administrada ao caranguejo, conforme já havia sido observado por Da Silva e Kucharski (1992) e Oliveira e da Silva (1999), porém, foram encontradas poucas diferenças entre animais intactos e apedunculados. Estes resultados sugerem que, talvez, o CHH não seja o único hormônio capaz de manter os níveis glicêmicos durante o estresse osmótico. Vários autores sugerem que a serotonina, a dopamina, as encefalinas ou até mesmo fatores semelhantes à insulina possam estar envolvidos no controle da glicemia em crustáceos

(Jaros, 1990; Fingerman e Nagabushanan, 1992; Lüschen e cols., 1993; Morriss e Airriess, 1998; Kucharski e cols., 1998). Outra hipótese seria da existência de algum outro sítio de produção de CHH fora do pedúnculo ocular. De Kleijn e cols. (1995) já isolaram o RNAm do CHH no sistema nervoso ventral da lagosta *Homarus americanus*.

Com o objetivo de avaliar o efeito do CHH sobre a glicemia de caranguejos *Chasmagnathus granulata* intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP e RC, foram administrados aos animais meios provenientes da incubação dos pedúnculos oculares em solução salina. O meio resultante da incubação de 4 pedúnculos oculares foi capaz de causar elevação nos valores glicêmicos em animais intactos e apedunculados alimentados com a dieta RC. Em animais RP, somente foi verificado efeito hiperglicêmico após a administração de meios provenientes da incubação de 8 ou 12 pedúnculos. Esses resultados reforçam a teoria de que a concentração circulante de glicose controla a liberação de CHH por retroalimentação negativa proposta por Santos e Keller (1993b).

Finalmente, foi testado o efeito de injeções das bioaminas serotonina e dopamina sobre a glicemia, em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RC e RP. A serotonina causou efeito hiperglicêmico dose - dependente em animais intactos e apedunculados alimentados com ambas as dietas. A dopamina causou efeito hiperglicêmico em animais intactos dos grupos RC e RP e, em caranguejos apedunculados do grupo RC. Além deste efeito, também foram verificadas alterações posturais após a administração dessas aminas. A serotonina causou hipertonicidade da musculatura flexora, enquanto, a dopamina causou rigidez em extensão. Segundo Fingerman e Nagabushanam (1992) as bioaminas têm um papel importante no controle da postura em crustáceos. Mais estudos envolvendo estas bioaminas serão necessários para esclarecer melhor seus efeitos sobre os níveis de glicose circulante e sobre a postura do caranguejo *C. granulata*.

ABSTRACT

In order to study the effects of starvation and refeeding upon the processes of glycogen, total lipids and total protein synthesis, C^{14} -glycine and C^{14} -glucose were injected in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on a high protein diet. Four hours after C^{14} -glucose injection, total radioactivity and C^{14} -glucose levels in the hemolymph were measured, as well as hepatopancreas, gills and muscle C^{14} -glycogen and C^{14} -total lipids in muscle and hepatopancreas. After C^{14} -glycine administration, total radioactivity levels in the hemolymph and total C^{14} -proteins and C^{14} -glycogen in hepatopancreas, gills and muscle were evaluated. The intrinsic capacity of glycogen and glucose synthesis of hepatopancreas, gills and muscle were studied *in vitro*, using C^{14} -glycine and C^{14} -glucose as precursors.

Glycogen synthesis from C^{14} -glucose *in vitro* was not affected by starvation and refeeding in none of the studied tissues. *In vivo*, after C^{14} -glucose administration, only a decrease of C^{14} -glycogen in gills was observed. In fed crabs a high lipid synthesis was verified after this injection, which was kept at this level during starvation and even more elevated during refeeding. This high lipogenic activity, allied with the elevated lipid concentration previously observed in this tissue (Kucharski and Da Silva, 1991b; Vinagre e Da Silva, 1992) suggest that, during refeeding, the C^{14} atom from glucose would be deviated from glycogen to lipid syntheses.

After C^{14} -glycine administration, decreases of muscle glycogen synthesis in starved crabs and of protein synthesis in refed crabs were observed. In the gills and hepatopancreas, protein and glycogen syntheses were not affected by starvation and refeeding. *In vitro*, glycogen synthesis from C^{14} -glycine was not affected by starvation and refeeding in none of the tissues studied. Glucose synthesis from C^{14} -glycine raised significantly only in the

muscle of refed crabs. These findings suggest that this crab uses glucose from muscle gluconeogenesis as a source of energy during starvation.

The effect of bilateral eyestalk ablation on carbohydrate metabolism during hyposmotic stress was studied in crabs maintained on high protein (HP) or carbohydrate-rich (RC) diets. In these experiments, the eyestalks were surgically removed 48h before hyposmotic stress. Hemolymph glucose level, free glucose and glycogen levels in hepatopancreas, muscle, anterior and posterior gills were studied in crabs throughout 144h in destilated water.

Two days after eyestalk ablation, hemolymph glucose reduced 30% in HP crabs and 60% in HC group compared to their own values just before surgery. At this moment, the only difference observed in relation to intact crabs was an elevation of free glucose levels in anterior gills.

During hyposmotic stress, a different pattern of carbohydrate metabolism was observed in relation to diets as already described for this species (Da Silva and Kucharski, 1992; Oliveira and Da Silva, 1999). In contrast, only few differences between intact and ablated crabs were found. These observations suggest two main possibilities: (1) there may be another source of CHH outside the eyestalk. De Kleijn et al (1995) found the mRNA of CHH in the ventral nervous system of the lobster *Homamarus americanus*, (2) other hormones or neuropeptides may control glucose levels in the hemolymph. The involvement of bioamines such as dopamine and serotonin, enkephalins, and an insulin-like factor on glucose control of crustaceans has already been described (Beltz, 1988; Jaros, 1990; Fingerman and Naggabushanan, 1992; Lüschen et al., 1993; Morriss e Airriess, 1998; Kucharski et al., 1998).

In order to better understand the effects of CHH on glucose hemolymph levels in crabs maintained on HP and HC diets, a eyestalks incubation media were injected in intact and ablated crabs. In HC intact and ablated crabs, 4 eyestalks incubation medium was able to elevate ($p < 0,05$) glucose levels but, in HP crabs, the hyperglycaemic effect was only observed when 8 or 12 eyestalks were used in the incubation medium. These findings suggest that glucose hemolymph levels influence CHH secretion by a negative feedback manner, as already proposed by Santos e Keller (1993b).

Finally, the effects of dopamine and serotonin injections on glucose hemolymph levels were studied in intact and bilateral eyestalk ablated crabs, fed on HP or HC diets. Serotonin caused, in all groups studied, a dose-dependent elevation in hemolymph glucose concentration. Dopamine injection also caused an hyperglycaemic effect in intact crabs of both groups, and in HC ablated crabs. Nevertheless, in HP ablated crabs, dopamine injection did not affected circulating glucose levels. More studies are necessary to explain bioamines involvement in crustacean glucose metabolism control.

These bioamines also caused a posture reaction in the crabs: after serotonin administration a hypertonic flexioned postured was observed, and after dopamine, a hypertonic extension occurred. These findings are in agreement with Fingerman and Naggabushanam's description (1992) that bioamines play an important role in posture control of crustaceans.

INTRODUÇÃO

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) é um animal típico da região sul do continente americano, ocorrendo em ambientes estuarinos desde o litoral sul do Rio de Janeiro, no Brasil, até o Golfo de San Martín, na Argentina (Rathbun, 1918; Boschi, 1964). No Rio Grande do Sul, é encontrado em marismas, também conhecidos como pântanos salgados, mas em outras regiões pode ser encontrado em manguezais, como o de Itacorubi, em Santa Catarina e o da Baía de Paranaguá, no Paraná (Branco, 1990; Brogin e Lana, 1997). Nos últimos anos, principalmente a partir do final da década de 80, esse caranguejo tem sido alvo crescente de atenção de vários grupos de pesquisa nas áreas de ecologia e fisiologia, principalmente no Rio Grande do Sul, Uruguai e Argentina.

Em 1980, Botto e Irigoyen constataram que essa espécie cava galerias, preferencialmente nos pisos supra e meso-litorâneos, com profundidades variáveis em função do nível das marés ou do lençol freático, de forma a manter sempre água no fundo. Mais recentemente, em 1990, Branco confirmou estas observações, descrevendo que no manguezal do Itacorubi, o *Chasmagnathus granulata* é encontrado durante todo o ano e forma colônias conhecidas como “caranguejais” nas zonas de espartineto e em clareiras, onde escavam tocas de profundidades variáveis, de acordo com o tipo de substrato, sendo comuns nas margens elevadas de rios e canais. Estas observações também são semelhantes às descritas por Boschi (1964) para o litoral da província de Buenos Aires.

Nos marismas do Rio Grande do Sul, esta espécie costuma ser encontrada preferencialmente em áreas inundáveis, com ou sem vegetação halo-hidrófila, com substrato mais rico em frações de silte e argila. Na Lagoa de Tramandaí, onde foram capturados os exemplares de *Chasmagnathus granulata* usados neste trabalho, o teor de oxigênio dissolvido na água varia desde 2,78 até 11,78 mgO₂/l e a salinidade de 0,22 até

34%. Para esta espécie, as habitações subterrâneas assumem um importante papel em sua ecofisiologia, pois diminuem as amplitudes de variações de salinidade e temperatura típicas de seu ambiente (Turcatto, 1990).

Em seu habitat, o *Chasmagnathus granulata* pode permanecer várias horas exposto ao sol, sendo considerado um caranguejo tipicamente semi-terrestre (Mañe-Garzon e cols., 1974; Branco, 1990), muito embora Santos e cols. (1987) tenham verificado que o sistema respiratório desses animais está pouco adaptado à respiração aérea. Segundo Turcatto (1990), sua atividade é variável conforme as estações do ano, aumentando no verão e diminuindo no inverno, quando fica restrita ao período mais quente do dia e às primeiras horas da madrugada. Estudos realizados por D'Incao e cols. (1988) verificaram que sua taxa metabólica diminui no outono e no inverno.

Segundo D'Incao e cols. (1990), o *Chasmagnathus granulata* pode ser considerado como de hábito alimentar generalista, com estratégias alimentares detritívora e oportunista. A análise de seu conteúdo estomacal revelou diferenças na quantidade de alguns itens alimentares conforme a estação do ano, o que pode ser atribuído a sua disponibilidade no ambiente. No inverno, há maior incidência de restos de vegetais superiores; nas demais estações, o item mais abundante é o sedimento e no verão, aumenta a proporção de itens de origem animal com relação às demais estações. Também foram encontrados restos de carapaça da própria espécie, evidenciando assim o hábito canibalista. Recentemente, estudando o manguezal da Baía de Paranaguá, Brogim e Lana (1997) confirmaram a maior incidência de itens de origem vegetal na dieta desse caranguejo e salientaram que a presença dos diversos itens alimentares em seu estômago pode variar em função da disponibilidade diferencial dos mesmos no habitat, influenciando o seu comportamento alimentar, assim como a presença de predadores pode restringir o acesso dos caranguejos a

determinados recursos. Entretanto, o valor calórico de sua dieta natural ainda permanece desconhecido.

O estudo do efeito da variação sazonal sobre o metabolismo energético desse caranguejo mostrou que o glicogênio do hepatopâncreas e do músculo constituem fonte de substrato energético durante a primavera e o verão. Os lipídeos musculares seriam utilizados como substrato energético no outono e no inverno, enquanto, os lipídeos do hepatopâncreas seriam mobilizados somente durante o período reprodutivo (Kucharski e Da Silva, 1991a).

O *Chasmagnathus granulata* é um animal de fácil adaptação às condições de laboratório, sendo seu nível glicêmico pouco afetado pelo manuseio ou pela troca de ambiente (Santos e Colares, 1986). Kucharski e Da Silva (1991b) verificaram que esse animal adapta-se com facilidade a diferentes dietas. A administração de uma dieta rica em proteínas (RP) ou em carboidratos (RC) provoca alterações significativas nos níveis de carboidratos teciduais: nos animais alimentados com a dieta RC, os níveis de glicose na hemolinfa e os de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo aumentam significativamente quando comparados àqueles dos animais alimentados com a dieta RP.

Trabalho posterior, realizado por Oliveira e Da Silva em 1997 no mesmo caranguejo, evidenciou pela primeira vez a presença da via gliconeogênica e a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no hepatopâncreas. Nesse trabalho, a comparação da capacidade de síntese de glicose a partir de alanina- C^{14} com aquela a partir do lactato- C^{14} , 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). As autoras sugerem que a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica

permite ao *C. granulata* responder a variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, a temperatura, o ciclo de marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose, principal substrato energético em crustáceos.

O *Chasmagnathus granulata* é capaz de sobreviver a longos períodos de restrição alimentar. A adaptação prévia a uma dieta rica em proteínas ou carboidratos altera o seu padrão de resposta metabólica ao jejum. Nos animais alimentados com dieta RC, os níveis de glicose hemolinfática diminuíram progressivamente nas duas primeiras semanas de jejum, permanecendo estáveis até o final do período experimental (2 meses). A concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo, que inicialmente era maior que aquela dos animais alimentados com dieta RP, diminuiu progressivamente, chegando a valores bastante reduzidos após dois meses de restrição alimentar. Nos animais alimentados com dieta RP, os valores de glicose hemolinfática apresentaram alterações significativas somente após um mês de jejum e permaneceram estáveis até o final do período experimental. Os valores de glicogênio hepatopancreático não se alteraram significativamente ao longo do período de restrição alimentar estudado. Contudo, os níveis de glicogênio muscular diminuíram ($p < 0,05$) no início do jejum, permanecendo sem alterações significativas até o final do período experimental. Nas brânquias, os valores de glicogênio foram semelhantes, tanto em animais alimentados com a dieta RP como naqueles submetidos à dieta RC, e diminuíram progressivamente ao longo do jejum, chegando a valores nulos após dois meses. (Vinagre e Da Silva, 1992).

A composição da dieta previamente administrada aos animais também alterou o padrão de resposta do metabolismo de lipídeos ao jejum. Nos animais alimentados com a dieta RC, os níveis de lipídeos totais na hemolinfa aumentaram cerca de 40% nas duas primeiras semanas de jejum, entretanto, ao final do período experimental, os valores eram

44% menores quando comparados aqueles dos caranguejos alimentados. No hepatopâncreas, os níveis de lipídeos totais não sofreram variações significativas ao longo do período de jejum estudado, contudo, no músculo, os valores de lipídeos totais diminuíram cerca de 54% em relação aos valores iniciais. Os níveis de lipídeos na hemolinfa dos animais do grupo RP aumentaram 100% nas duas primeiras semanas de jejum, mas ao final do período experimental retornaram a valores similares aos iniciais. Já os níveis de lipídeos totais no hepatopâncreas diminuíram cerca de 51% após dois meses de jejum. Contudo, no músculo não foram constatadas variações significativas ao longo do período de jejum estudado (Vinagre e Da Silva, 1992).

Os resultados obtidos por Vinagre e da Silva (1992) sugerem que durante o jejum, nos animais alimentados com a dieta RC, os níveis glicêmicos seriam inicialmente mantidos pelo processo de glicogenólise e posteriormente por uma ativação da via gliconeogênica. Por outro lado, nos animais alimentados com a dieta RP, provavelmente a via gliconeogênica já estaria ativada devido ao grande aporte de aminoácidos oriundos da dieta, sendo responsável pela manutenção da glicemia ao longo do jejum, constatada nesse grupo.

No trabalho de Vinagre (1992) também foi estudado o efeito do jejum sobre o metabolismo de proteínas, mas ao contrário do observado com relação ao metabolismo de carboidratos e lipídeos, a administração de uma dieta RC ou RP não causou alterações significativas nos parâmetros analisados. Recentemente, Schein (1999) determinou as concentrações micromolares de diferentes aminoácidos, em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com as dietas RC ou RP, e não constatou diferença significativa entre os dois grupos experimentais. Os principais aminoácidos circulantes foram: a glicina, a serina, a arginina, a alanina e a prolina.

Estudando o efeito do jejum sobre a capacidade de conversão de alanina-C¹⁴ ou lactato-C¹⁴ em glicose-C¹⁴, Oliveira (1993) verificou que nos animais previamente alimentados com a dieta RP, no terceiro dia de jejum, ocorreu uma redução na capacidade de síntese de glicose a partir de alanina-C¹⁴. Contudo, aos 15 dias de restrição alimentar, a gliconeogênese a partir de alanina-C¹⁴ aumentou significativamente em relação aos valores iniciais, para novamente diminuir ($p < 0,05$) aos 21 dias de jejum. A incorporação do C¹⁴ do ácido láctico em glicose nos períodos de jejum estudados aumentou significativamente em relação aos valores iniciais para novamente diminuir ($p < 0,05$) aos 15 dias de jejum. Nos animais alimentados com a dieta RC, o glicogênio hepatopancreático parece ser a principal fonte energética durante o período de restrição alimentar, apesar da conversão de alanina-C¹⁴ em glicose ter aumentado aos 15 dias de jejum. Quando foi utilizado o ácido láctico-C¹⁴, a síntese de glicose foi significativamente menor aos 6, 15 e 21 dias de jejum. Estes resultados reforçaram os dados obtidos por Vinagre e da Silva (1992).

A realimentação após períodos de restrição alimentar pode ser definida como sendo um estado nutricional transitório, com características distintas tanto do jejum como do período absorptivo, podendo até ser considerado um “estado de histeria metabólica”, onde os processos de síntese são reativados, porém de forma demorada ou exacerbada (Sugden e cols., 1989). Em ratos realimentados após 40 horas de jejum, Calder e Geddes (1992) constataram um aumento marcante na síntese de glicogênio no músculo e no fígado, alcançando valores superiores aos dos animais alimentados. Essa “superestimulação” na síntese de glicogênio foi verificada também no fígado e no músculo da tartaruga *Phrynops hilarii* e do peixe *Rhamdia hilarii*, quando realimentados após 30 dias em jejum (Da Silva e Migliorini, 1990; Machado e cols., 1988). Na literatura consultada foi encontrado apenas um trabalho sobre realimentação em crustáceos em que são descritas alterações sobre o

consumo de oxigênio e sobre a temperatura corporal, entretanto nada é mencionado sobre o metabolismo intermediário (Hervant e cols., 1997).

Está bem documentado na literatura que em áreas estuarinas e intertidais, as flutuações constantes da salinidade impõem um estresse iônico e ambiental a sua biota. Essas variações de salinidade levam os organismos estuarinos e marinhos intertidais a mudanças na composição orgânica e inorgânica de seus fluidos corporais, exigindo ajustes homeostáticos compensatórios (Bishop e Burton, 1993; Pillet e cols., 1995; Schein, 1999). Entre os crustáceos decápodos, encontram-se desde animais marinhos estenoalinos com pouca ou nenhuma capacidade osmorreguladora até animais eurialinos capazes de tolerar grandes variações da salinidade do meio com mínimas alterações da concentração osmótica de sua hemolinfa (Gilles, 1983; Mantel e Farmer, 1983; Schein, 1999).

Mañe-Garzon e cols. em 1974, classificaram o *Chasmagnathus granulata* como hiper - hiporregulador, por suportar amplas variações de salinidade, isto é, em meio de alta concentração mantém o plasma hiposmótico, e em meio diluído, mantém o plasma hiperosmótico . Em 1992, Bromberg sugeriu que esse caranguejo seria um regulador hiper-hiposmótico eurialino, uma vez que suporta uma ampla variação de salinidade, sendo capaz de hiperregular de 0‰ a 20‰ e hiporregular em 40‰. Seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰ no inverno e verão, respectivamente. Pode-se destacar o processo de regulação isosmótica intracelular como sendo parte dos mecanismos envolvidos na adaptação desse caranguejo a meios de diferentes salinidades, visto que as concentrações hemolinfáticas de íons e efetores orgânicos sofrem alterações consideráveis após choques osmóticos. O processo osmoregulador ocorre em duas etapas, uma de curta duração e outra de longa duração, o que permite uma melhor adaptação do animal ao seu habitat. A estratégia de curta duração parece envolver a ativação de enzimas pré - existentes,

enquanto a estratégia de longa duração parece envolver a síntese de ATPase Na^+/K^+ dependente.

Cervino e cols. (1996) demonstraram que caranguejos *Chasmagnathus granulata* adaptados durante 45 dias às salinidades de 7, 12, 20 ou 34‰ quando submetidos a um experimento onde tinham a liberdade de escolher uma entre estas quatro salinidades, optaram pela salinidade mais elevada quando tinham sido previamente aclimatados à salinidade de 20 ou 34‰, enquanto aqueles animais aclimatados à baixas salinidades não apresentaram nenhuma preferência estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Santos e Nery (1987) demonstraram alterações nos níveis de glicose na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata* quando submetidos a diferentes salinidades. Em caranguejos aclimatados a 30‰ e expostos a uma salinidade de 10‰ ou 20‰ não foram constatadas alterações significativas nos valores de glicose hemolinfática. Já os animais aclimatados à 30‰ e submetidos a uma salinidade de 0‰, por diferentes tempos, apresentaram valores de glicose na hemolinfa próximos de zero mg/ml após 72 horas. Os valores glicêmicos foram estabelecidos somente após 168 horas de estresse osmótico. Nos animais aclimatados à 30‰ e após submetidos a salinidade de 40‰, os níveis de glicose na hemolinfa atingiram valores nulos e permaneceram assim até o final do período experimental. Esses autores sugerem que essa espécie é melhor adaptada ao estresse hiperosmótico que ao hiposmótico.

As diferenças sazonais na composição de carboidratos em diferentes tecidos do *Chasmagnathus granulata* parecem interferir também na sua capacidade osmorreguladora. No verão, após os choques hipo ou hiperosmótico, os níveis de carboidratos aumentaram em quase todos os tecidos estudados por Nery e Santos (1993), sugerindo a ativação da via

gliconeogênica. Contudo, no inverno, em ambos os tipos de estresse osmótico, ocorreu mobilização de carboidratos somente nas brânquias.

A dieta a qual o *Chasmagnathus granulata* é adaptado antes de iniciar o estresse osmótico também altera a resposta do metabolismo de carboidratos durante esse processo (Da Silva e Kucharski, 1992; Schein, 1999). Durante o estresse hiposmótico, os animais que receberam uma dieta RC, apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de glicogênio hepatopancreático e muscular. Entretanto, no grupo que recebeu a dieta RP, o glicogênio do hepatopâncreas aumentou e o muscular permaneceu inalterado após 72 horas de estresse hiposmótico, sugerindo o envolvimento da via gliconeogênica (Da Silva e Kucharski, 1992).

A dieta também influencia o padrão de resposta do metabolismo de carboidratos do *Chasmagnathus granulata* durante o estresse hiperosmótico. Nos caranguejos alimentados com dieta RC e submetidos ao estresse hiperosmótico por um período de até 144h, a concentração de glicose hemolinfática aumentou 40% no final do período experimental. Os níveis de glicose livre no hepatopâncreas e a captação de glicose por este tecido aumentaram significativamente após 72h, ainda que os níveis de glicogênio hepatopancreático não tenham sido alterados ao longo do período experimental estudado. No tecido muscular, 144h de estresse hiperosmótico aumentaram os níveis de glicogênio em 3,7 vezes e os de glicose livre em 30%, embora a captação de glicose não tenha sido alterada. As concentrações de glicose livre e de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores desses animais não foram afetadas pelo estresse hiperosmótico. Nos animais alimentados com dieta RP e submetidos aos mesmos tempos de estresse osmótico, a concentração de glicogênio hepatopancreático diminuiu 60% e os níveis de glicose livre aumentaram 40%, contudo, a captação de glicose não se alterou significativamente. Os

valores de glicose hemolinfática, igualmente não sofreram alterações significantes ao longo do período de estresse estudado. No tecido muscular desses animais não foram verificadas variações significantes dos valores de glicogênio, de glicose livre e da captação de glicose. Tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores, o estresse hiperosmótico aumentou os níveis de glicose livre e de glicogênio. Em ambas dietas, 72h de estresse hiperosmótico não determinaram alterações significativas na capacidade de captação de glicose nas brânquias anteriores e posteriores (Schein, 1999).

Em 1999, Oliveira e Da Silva demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática na adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo *C.granulata*. Animais alimentados com dieta RP e submetidos ao estresse hiposmótico durante um período de 144h apresentaram um aumento na capacidade gliconeogênica a partir de alanina-C¹⁴ às 72h de estresse. Nos animais submetidos à uma dieta RC o aumento somente foi verificado às 144h de estresse. Porém, quando o substrato utilizado era o ácido láctico-C¹⁴, ambos grupos apresentaram uma redução na capacidade gliconeogênica a partir de 72h de estresse hiposmótico.

Os aminoácidos tissulares (principalmente arginina, alanina, glicina, prolina, ácido glutâmico e taurina) são considerados os principais efetores orgânicos osmoticamente ativos em crustáceos, contribuindo com cerca de 50% da concentração osmótica intracelular (Gilles, 1982; Robertson e cols., 1992). A administração de uma dieta RC ou RP não altera significativamente as concentrações de aminoácidos, (arginina, serina, prolina, glicina, alanina) na hemolinfa do *Chasmagnathus granulata*. Entretanto, quando estes animais foram submetidos ao estresse hiperosmótico, diferenças significativas nas concentrações hemolinfáticas desses aminoácidos foram observadas nos animais alimentados com as dietas RP ou RC. No grupo RP os níveis hemolinfáticos de glicina

diminuíram e as concentrações de arginina, de alanina e de prolina aumentaram ao longo do período de estresse osmótico estudado. Contudo, as concentrações de serina não sofreram variações significativas. Nos animais alimentados com dieta RC, as concentrações hemolinfáticas de glicina, de serina e de arginina diminuíram marcadamente durante o estresse hiperosmótico, enquanto os níveis de alanina e de prolina permaneceram constantes no período de estresse estudado (Schein, 1999).

Nos crustáceos em geral, vários tecidos com funções endócrinas já foram descritos: o órgão Y, a glândula androgênica, os ovários, o órgão pericárdico, o órgão pós-comissural, o complexo órgão X-glândula do seio e o sistema nervoso, incluindo o gânglio estomatogástrico. O órgão pericárdico, localizado no seio venoso próximo ao coração, é o principal local de produção periférica de monoaminas como a serotonina, a dopamina e a octopamina e de vários peptídeos como a proctolina, o peptídeo cardioativo de crustáceos e peptídeos relacionados a FMRF-amida (Fingerman, 1997; Morris e Airriess, 1998). O sistema nervoso produz também monoaminas e neuropeptídeos, como o hormônio estimulador das gônadas (GSH), por exemplo (Beltz, 1988; Fingerman, 1997).

O órgão X recebeu este nome, pois quando foi identificado a sua função era desconhecida, mas já haviam evidências de que a glândula do seio, assim chamada por estar localizada próxima a um seio venoso, exercia algum papel no controle da muda. Foi somente em um “histórico dia” de 1951 que Bliss e Passano esclareceram o funcionamento do complexo órgão X - glândula do seio, em decápodas, geralmente localizado no pedúnculo ocular (Fingerman, 1997). Este sistema tem funcionamento análogo ao sistema hipotálamo - neurohipófise dos vertebrados, isto é, a glândula do seio é o local de armazenamento temporário de hormônios produzidos no órgão X que são transportados por feixes axonais (Beltz, 1988; Fingerman, 1997).

O órgão X produz uma indoleamina, a 3-OH-K-hidroxi-L-quinurenina e vários peptídeos: o hormônio concentrador de pigmentos vermelhos (PCH ou RPCH), o hormônio dispersador de pigmentos (PDH), o hormônio inibidor do órgão mandibular (MOIH), o hormônio inibidor da muda (MIH), o hormônio inibidor da vitelogênese (VIH) e o hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) (Keller, 1992; Nery, 1999). A 3-OH-K-hidroxi-L-quinurenina parece ter um efeito inibitório sobre o órgão Y, também chamado “glândula da muda”, inibindo a produção de ecdisteróides, porém exerce seu efeito de forma indireta, transformando-se em ácido xanturênico (Fingerman e cols., 1994).

O PCH, por ter alta afinidade estrutural com o hormônio adipocinético de insetos (AKH), faz parte de uma família de neuropeptídeos, típica de artrópodes, conhecida como família AKH/RPCH. O PDH faz parte da família de octapeptídeos PDH/PDF, devido à sua semelhança estrutural com o fator dispersante de pigmentos (PDF) encontrado em insetos. Em crustáceos, o PCH e o PDH parecem ter ampla distribuição e coexistir em várias partes do sistema neuroendócrino, podendo ser encontrados fora do sistema órgão X–glândula do seio, o que sugere que estes peptídeos, além de agirem como neurohormônios, também possam atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores (Nery, 1999).

Segundo Keller (1992), o CHH, o MIH e o VIH fazem parte de uma família de peptídeos conhecida como “família de peptídeos semelhantes ao CHH”, por ser este hormônio o seu principal representante. Recentemente, outro peptídeo, com estrutura química semelhante, foi identificado no órgão mandibular do caranguejo *Cancer pagurus* e foi chamado de “hormônio inibidor do órgão mandibular” e incluído na família (Soyez, 1997). Até a revisão de Keller (1992), acreditava-se que estes neuropeptídeos ao serem liberados pela glândula do seio, agissem como neurohormônios, pois havia poucas evidências de que fossem produzidos em outras regiões do sistema nervoso, onde agiriam

também como neurotransmissores ou neuromoduladores. Porém, já foi isolado o RNAm do CHH no sistema nervoso ventral da lagosta *Homarus americanus* (De Kleijn e cols., 1995). Recentemente, Chang e cols. (1998) verificaram, através da técnica de ELISA, valores de $1,8 \pm 1,6$ fmol/ml de CHH em animais apedunculados 3 meses após a cirurgia.

Até pouco tempo, essa família de peptídeos era considerada exclusiva dos crustáceos, porém já foram identificados peptídeos com estruturas semelhantes em outros invertebrados: como no gafanhoto *Schistocerca gregaria*, na aranha *Latrodectus mactans*, na centípeda *Lithobius forficatus* e no escorpião *Euscorpilus carpathicus*, embora suas funções ainda não tenham sido esclarecidas (Soyez, 1997).

O hormônio inibidor da vitelogênese (VIH), também chamado de hormônio inibidor da gônada (GIH), tem efeito inibitório sobre a vitelogênese. O hormônio inibidor da muda (MIH) age sobre o órgão Y, inibindo a produção dos ecdisteróides, que ativam o processo de muda (Beltz, 1988; Keller, 1992; Fingerman, 1997).

A existência de um “fator diabetogênico” em crustáceos foi descrita pela primeira vez por Abramowitz e cols. em 1944 e a estrutura química do hormônio hiperglicemiante de crustáceos foi elucidada por Kegel e cols. em 1989. Os CHHs são peptídeos com cerca de 72-74 resíduos de aminoácidos cujo peso molecular varia entre 6-9kDa (Keller, 1992; Kummer e Keller, 1993; Sefiani e cols., 1996; Smullen e cols., 1996; Soyez, 1997). Estudos clássicos mostram que 5 minutos após a injeção de extratos de pedúnculo ocular ou do próprio hormônio ocorre hiperglicemia na maioria dos crustáceos prolongando-se por até duas horas (Santos e Keller, 1993c). No caranguejo *Chasmagnathus granulata*, uma hora após a injeção de extratos do próprio pedúnculo ocular, foi observada elevação da concentração de glicose hemolinfática (Santos e Colares, 1986). Além deste efeito

hiperglicemiante, o CHH também age como secretagogo, estimulando o hepatopâncreas a secretar amilase (Keller e Sedlmeier, 1988).

A técnica de radioimunoensaio (RIA) para o CHH foi descrita pela primeira vez por Keller em 1988. Utilizando esta técnica, Keller e Orth (1990) verificaram que em lagostins *O. limosus* em repouso, moderadamente alimentados e não estressados, os níveis de CHH hemolinfático correspondem a 13fmol/ml e podem sofrer alterações conforme o estado nutricional, o ritmo circadiano, a temperatura e os níveis de oxigênio na água. Em animais apedunculados não foi detectado CHH na hemolinfa. Utilizando uma técnica de radioimunoensaio mais específica, desenvolvida com anti-soro contra frações de CHH purificadas por HPLC, Webster (1996) constatou que os níveis de CHH, de glicose e de lactato hemolinfáticos, aumentaram drasticamente uma hora após a emersão do caranguejo *Cancer pagurus*.

Em 1993, Santos e Keller, utilizando a técnica de ensaio imunoabsorvente (ELISA), por eles desenvolvida, verificaram que os níveis de CHH hemolinfático diminuíram após injeção de glicose e aumentaram após administração de lactato. Posteriormente, Keller e cols. (1994), utilizando também esta técnica, verificaram, em glândulas do seio isoladas, um aumento na secreção desse hormônio após elevação na concentração de potássio. Recentemente, Chang e cols (1998), também utilizando a técnica de ELISA, verificaram que na lagosta *Homarus americanus*, os valores de CHH em animais em condições basais correspondem a 4,0 fmol/ml, contudo aumentaram significativamente após elevação da temperatura, exposição ao ar e durante o choque osmótico. Estes autores verificaram em animais apedunculados, valores de $1,8 \pm 1,6$ fmol/ml de CHH hemolinfático até 3 meses após a cirurgia. Ao expor estes animais a emersão, os valores de CHH elevaram-se para

13,6± 8,1fmol/ml, indicando a liberação de CHH de algum outro sítio fora do pedúnculo ocular.

Em 1987, Sedlmeier identificou o hepatopâncreas como tecido - alvo do CHH constatando que este hormônio tem um efeito inibidor sobre a síntese de glicogênio no lagostim *Orconectes limosus*. Além do hepatopâncreas, evidências sugerem que o CHH também possa agir sobre os hemócitos (Johnston e Davies, 1972; Santos e Stefanelo, 1991), o tecido muscular, o tegumento (Keller e Andrew, 1973; Santos e cols., 1988), as gônadas e as brânquias (Morriss e Airiness, 1998).

Em caranguejos *Chasmagnathus granulata*, alimentados com carne bovina e adaptados a salinidade de 28‰, Santos e cols. (1988) observaram uma redução significativa na concentração de glicose hemolinfática no dia seguinte à ablação bilateral dos pedúnculos oculares. A injeção de glicose exógena em animais apendunculados aumentou a concentração de glicose na hemolinfa por 30 minutos, enquanto nos animais intactos a hiperglicemia prolongou-se por duas horas. Estes resultados sugerem que parte do efeito hiperglicêmico do CHH ocorra pela diminuição na utilização de glicose pelos tecidos. Nesse trabalho, amostras de hepatopâncreas, de brânquias e de músculo foram incubadas em solução salina durante duas horas, na ausência ou na presença de glicose e extrato de pedúnculo ocular, e somente foi observada diminuição na captação de glicose em presença do extrato de pedúnculo no músculo. Posteriormente, Santos e Stefanello (1991) contataram que o CHH também tinha efeito sobre os hemócitos, aumentando a liberação de glicose para o plasma.

A comparação entre os efeitos dos CHHs de *Carcinus maenas* e de *Orconectes limosus* com o extrato do pedúnculo ocular de *Chasmagnathus granulata* foi realizada por

Nery e cols. (1993). Estes autores verificaram que os hormônios das duas espécies foram capazes de causar hiperglicemia em *C.granulata*, porém apresentaram diferentes efeitos sobre os níveis de glicogênio hemolinfático e muscular. A injeção do CHH de *C. maenas* causou diminuição nos níveis de glicogênio muscular e hemolinfático e da glicose livre muscular, enquanto, a injeção do CHH de *O.limosus* não alterou o glicogênio hemolinfático e elevou significativamente os níveis de glicogênio muscular. Esses autores sugerem a existência de diferentes receptores em cada tecido, o que explicaria o envolvimento de diferentes rotas bioquímicas na obtenção do mesmo efeito biológico. Segundo Keller (1992), os CHHs de *O.limosus* e *C.maenas* possuem 61% de homologia estrutural.

Em 1993, Kummer e Keller, estudando os receptores do CHH em membranas de hepatopâncreas de *C.maenas* e de *O.limosus*, demonstraram a existência de receptores de alta afinidade para o CHH neste tecido. Também verificaram que o CHH de *Carcinus* ligava-se aos receptores de *Orconectes* e vice-versa, porém com baixa afinidade. Esses autores sugerem que tanto a molécula do hormônio como a do receptor evoluíram juntas (co-evolução). Webster (1993), estudando os sítios de ligação ao CHH e ao MIH em membrana do órgão Y, verificou que este órgão também possuía receptores para o CHH, sugerindo um possível papel deste hormônio na regulação da muda.

A estrutura primária do CHH das diferentes espécies de crustáceos estudadas apresenta cerca de 60% de homologia, enquanto o VIH e o MIH apresentam 50% de homologia quando comparados entre si e apenas 30% de homologia com o CHH. A comparação entre a seqüência peptídica do MIH do caranguejo *Carcinus* com o VIH da lagosta *Homarus*, por exemplo, revelou que estes peptídeos apresentaram mais homologia (48%) entre si do que com o CHH da própria espécie. O MIH da lagosta *Homarus*

americanus causou hiperglicemia e o CHH de *Carcinus* inibiu a síntese de ecdisteróides em órgãos Y isolados, revelando que pode haver sobreposição funcional entre estas moléculas, o que não é surpreendente tendo em vista a grande homologia entre elas (Keller, 1992).

Os efeitos pós - receptor do CHH parecem ser mediados por uma elevação nos níveis dos nucleotídeos cíclicos. A injeção de CHH provocou um aumento significativo dos níveis de GMPc e AMPc no músculo e no hepatopancreas, que atingiram o zênite 10 a 20 min após a administração, quando ocorreu a elevação na glicemia (Sedlmeier e Keller, 1981). Em estudos "in vitro", o efeito do CHH foi mimetizado tanto pelo dibutiril-GMPc como pelo dibutiril-AMPc (Sedlmeier, 1987). Posteriormente, Smullen e cols., (1996) verificaram o envolvimento do fosfatidil-inositol na formação dos nucleotídeos cíclicos: a ligação do CHH ao seu receptor ativaria a formação de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3), que se ligaria a receptores no retículo endoplasmático causando a liberação de Ca^{+} para o citoplasma. O Ca^{+} citosólico, por sua vez, ligando-se a calmodulina, ativaria as enzimas adenilato e guanilato ciclases, formando os nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc. Estes nucleotídeos cíclicos parecem ativar uma proteína quinase nucleotídeos cíclicos dependente, que inibiria a glicogênio sintase e ativaria a glicogênio fosforilase, resultando na elevação da glicose hemolinfática. Entretanto, esses autores ressaltam que o envolvimento do Ca^{+} como segundo - mensageiro tem sido evidenciado indiretamente e ainda precisa ser mais investigado.

Os peptídeos da família do CHH geralmente são polimórficos: na lagosta americana foram identificadas quatro isoformas de CHH, no lagostin *Procambarus clarkii* três isoformas e no camarão *Penaeus japonicus* 5 isoformas. A análise da seqüência de aminoácidos revela poucas diferenças entre estas isoformas (Keller, 1992; Soyez, 1997). Evidentemente, estudos específicos sobre a função de cada um destes peptídeos e suas

isoformas serão necessários para a melhor compreensão de seus efeitos biológicos. Segundo Nery e cols. (1993), provavelmente, no caranguejo *C.granulata* também existiriam diferentes isoformas de CHH.

A comparação entre o efeito biológico de diferentes isoformas de CHH e seu papel na osmorregulação foi feita por Charmantier-Daures e cols. (1994) na lagosta *Homarus americanus*. Após a ablação bilateral dos pedúnculos oculares, as lagostas eram mantidas em água marinha durante dois meses. Os experimentos começaram com os animais na fase C4 do período de intermuda, com a adição progressiva (três dias) de água doce aos tanques. Os experimentos eram realizados 4 dias após a redução da salinidade, quando a osmolaridade da hemolinfa já estava estabilizada. A capacidade osmoreguladora, diferença entre a osmolaridade da hemolinfa e a do meio, diminuiu significativamente nos animais apedunculados em relação aos controles. A injeção de extrato total de glândula do seio aumentou significativamente a capacidade osmoreguladora das lagostas sem pedúnculo e injeções de frações do extrato de pedúnculo ocular purificadas por HPLC, correspondentes a duas isoformas de CHHs, provocaram efeitos semelhantes. Estas duas frações e outras duas que não tinham alterado a capacidade osmoreguladora também apresentaram efeito hiperglicêmico, confirmando estudo anterior em que havia descrito 4 isoformas de CHH nessa lagosta.

Além dos peptídeos da família do CHH, outros hormônios ou neuromoduladores, parecem influenciar os níveis circulantes de glicose, atuando diretamente sobre os tecidos periféricos ou regulando a liberação do CHH. Vários autores sugerem que monoaminas como a serotonina, a dopamina e peptídeos opiáceos como a Leu-encefalina possam regular os valores de glicose hemolinfática (Bauchau e cols., 1968; Beltz, 1988; Fingerma e

Nagabhushanam, 1992; Fingerman e cols., 1994; Lüschen e cols., 1993; Rothe e cols., 1991; Sarojini e cols., 1995; Morris e Airriess, 1998).

O uso de técnicas imunocitoquímicas e HPLC tem revelado a presença de neuroreguladores clássicos em várias espécies de crustáceos, como por exemplo acetilcolina, GABA, dopamina, histamina, serotonina e octopamina (Fingerman e Nagabhushanam, 1992; Fingerman e cols., 1994). Estes autores também constataram que aminas e peptídeos podem coexistir no mesmo neurônio, como por exemplo, o peptídeo proctolina que foi encontrado em neurônios colinérgicos, serotoninérgicos ou dopaminérgicos da lagosta *Homarus americanus* (Beltz, 1988; Fingerman e Nagabhushanam, 1992). Também, mais de uma amina pode ser produzida pelo mesmo neurônio, como ocorre na lagosta *Homarus gamarus*, onde a serotonina e a dopamina coexistem em neurônios ganglionares (Fingerman e cols., 1994).

A presença de serotonina e dopamina em várias espécies de crustáceos, já foi identificada por técnicas imunocitoquímicas, HPLC e eletroforese, no sistema nervoso central, incluindo o pedúnculo ocular, nos gânglios periféricos, como o gânglio estomatogástrico e nos órgãos neuroendócrinos, como o órgão pericárdico (Fingerman e cols., 1994; Fingerman, 1997; Morriss e Airriess, 1998). No sistema nervoso central, estas monoaminas podem agir como neurotransmissores, neuromoduladores ou neuro-hormônios. Sistemicamente agem principalmente como neuro-hormônios (Beltz, 1988; Fingerman e cols., 1994). Evidências sugerem que elas estariam envolvidas no controle de diversos processos como a muda, a mudança de cor, a reprodução, a osmoregulação, a atividade cardíaca, a contração muscular, a atividade neuronal, a quimio e mecanorecepção, o comportamento e o metabolismo de carboidratos (Fingerman e cols., 1994; Morris e Airriess, 1998).

O órgão pericárdico é um órgão neuroendócrino localizado no seio venoso próximo ao coração e controla a atividade cardíaca, principalmente, através da liberação do peptídeo cardioativo de crustáceos. Este órgão é considerado o principal local de produção periférica de monoaminas, como a serotonina, a dopamina, a adrenalina, a noradrenalina e a octopamina, que são cardioexcitatórias (Florey e Rathmayer, 1978; Beltz, 1988; Fingerman e Nagabhushanam, 1992). Segundo Morris e Airriess (1998), os efeitos da serotonina e da dopamina em tecidos - alvo cardiovasculares de decápodos estariam relacionados ao aumento dos níveis de AMPc intracelulares. Contudo, investigações sobre seus receptores em crustáceos são necessárias.

A serotonina e a octopamina têm um papel importante no controle da postura em crustáceos. A administração de serotonina e de octopamina em lagostas e lagostins causa marcantes efeitos posturais: a serotonina injetada produz uma forte flexão dos membros e abdômen, enquanto a octopamina causa uma forte extensão (Beltz, 1988). Segundo Fingerman e Nagabhushanam (1992), a serotonina ativa um programa central para a flexão postural e a octopamina ativa um programa para a extensão postural.

Fortes evidências indicam que a serotonina e a dopamina também estariam envolvidas no processo de osmoregulação. A concentração de dopamina na hemolinfa de *Carcinus maenas* aumentava quando este caranguejo era submetido a um choque hiposmótico (Zatta, 1987). Nesta mesma espécie, as injeções de dopamina e de extratos de órgão pericárdico estimularam a captação de sódio e a atividade da ATPase Na^+/K^+ (Sommer e Mantel, 1988; 1991). Nas brânquias posteriores de *Eriocheir sinensis* (osmorreguladoras) foram encontrados receptores tanto para dopamina como para serotonina. A administração destas aminas aumenta os níveis de AMPc e a atividade da ATPase Na^+/K^+ (Trausch e cols., 1989) Segundo Sommer e Mantel (1991) e Trausch e

cols. (1989), a elevação dos níveis de AMPc, provavelmente desencadeada por dopamina, estaria envolvida no processo de adaptação, a curto - prazo, ao estresse osmótico.

Injeções das monoaminas: dopamina, serotonina, octopamina, adrenalina e noradrenalina causaram, no caranguejo *Carcinus maenas*, efeito hiperglicemiante dependente da dose (Lüschen e cols., 1993). Entretanto, em lagostins *Procambarus clarkii* intactos, a injeção de dopamina causou efeito hipoglicemiante dose - dependente, não alterando a glicemia de animais apedunculados Este efeito hipoglicemiante foi bloqueado pela injeção do antagonista dopaminérgico espiperone. Em estudo *in vitro* com a adição de dopamina ao meio de incubação de pedúnculos oculares, ocorreu diminuição significativa da liberação de CHH (Sarojini e cols., 1995).

O efeito hiperglicêmico da serotonina em crustáceos foi descrito pela primeira vez por Bauchau e Mengeot em 1966 no caranguejo *Carcinus maenas*. Posteriormente, foi verificado nos caranguejos *Orconectes limosus* (Keller e Beyer, 1968), *Eriocheir sinensis* (Bauchau e cols., 1968), *Barythelphusa guerini* (Fingerman e cols., 1981) e *Gecarcoidea natalis* (Morris e Airriess, 1998), no lagostim *Astacus leptodactylus* (Strolemberg e van Herp, 1977) e no isópode *Porcellio dilactatus* (Martin, 1978). Bauchau e cols. em 1968, verificaram no caranguejo *Eriocheir sinensis*, que esse efeito estaria relacionado a um aumento da atividade da enzima fosforilase em tecido muscular. Esses autores concluíram que a serotonina teria efeito semelhante ao do hormônio hiperglicemiante. Comparando os efeitos de injeções de serotonina entre animais intactos e animais que sofreram remoção bilateral dos pedúnculos oculares, alguns autores verificaram hiperglicemia também em animais apedunculados (Bauchau e Mengeot, 1966; Lüschen e cols., 1993; Morriss e Airiness, 1998).

Além das monoaminas, peptídeos opiáceos também parecem interferir no controle dos níveis circulantes de glicose em crustáceos, agindo principalmente como neuromoduladores (Jaros, 1990; Rothe e cols., 1991; Lüschen e cols., 1993; Sarojini e cols., 1995). A existência de Leu-encefalina e Met-encefalina já foi comprovada em algumas espécies de crustáceos, como no caranguejo *Uca pugillator*, por exemplo (Jaros, 1990; Lüschen e cols., 1993). No *Chasmagnathus granulata*, o sistema opiáceo parece estar envolvido na modulação da resposta de escape a um estímulo perigoso (Vallegia e cols., 1989; Maldonado e cols., 1989; Lozada e cols., 1990; Romano e cols., 1990 e 1991). Injeções de Leu-encefalina causaram efeito hipoglicemiante bloqueável por naloxane em *Uca pugillator* (Jaros, 1990; Rothe e cols., 1991; Lüschen e cols., 1993), *Carcinus maenas* (Rothe e cols., 1991) e *Procambarus clarkii* (Sarojini e cols., 1995). Em *U. pugillator* e *P. clarkii*, a injeção de Leu-encefalina em animais apedunculados não alterou os valores glicêmicos, porém quando os pedúnculos oculares eram incubados em meio com Leu-encefalina, a liberação de CHH, avaliada pelo efeito da injeção deste meio sobre a glicemia de animais intactos, diminuiu (Rothe e cols., 1991; Sarojini e cols., 1995). Receptores de Leu-encefalina já foram identificados por Hanke e cols. (1993) em neurônios contendo grânulos de CHH.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando que a administração prévia de uma dieta rica em carboidratos ou proteínas modifica o padrão de resposta metabólica ao jejum e ao estresse hiposmótico em *Chasmagnathus granulata*, este trabalho teve como objetivos estudar *in vivo* e *in vitro* o efeito do jejum-realimentação sobre os processos endergônicos de síntese em animais alimentados com a dieta rica em proteínas, determinar a participação do hormônio hiperglicêmico sobre o metabolismo de carboidratos durante a adaptação ao meio hiposmótico em caranguejos mantidos com as dietas rica em proteínas ou carboidratos e a influência da composição da dieta sobre a resposta a este hormônio.

Para isto pretendeu-se:

1. Verificar *in vivo* e *in vitro* o efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de glicogênio, proteínas totais e lipídeos totais no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas.
- 1) Determinar o efeito da remoção dos pedúnculos oculares sobre o metabolismo de carboidratos durante o estresse hiposmótico em caranguejos *Chasmagnathus granulata* previamente alimentados com a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas.
- 2) Verificar o efeito de injeções de meio resultante da incubação dos pedúnculos oculares sobre a glicemia de animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas rica em proteínas ou rica em carboidratos.
- 3) Testar o efeito das bioaminas serotonina e dopamina sobre os níveis hemolinfáticos de glicose em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com as dietas rica em carboidratos ou proteínas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e manutenção dos animais

Caranguejos *Chasmagnathus granulata* DANA, 1851 (DECAPODA-GRAPSIDAE) machos e em período de intermuda (Drach e Tchernigovzeff, 1967) foram capturados no município de Imbé, Rio Grande do Sul, na margem leste da Lagoa de Tramandaí. As coletas foram realizadas com permissão das autoridades do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Este ambiente é tipicamente estuarino, influenciado tanto pelas águas do Oceano Atlântico como pelo sistema Lagunar de Tramandaí, onde o nível das águas é determinado pelos ventos (Würdig, 1984). O clima da região é considerado subtropical úmido sem estação seca, com temperatura média anual de 17,6 °C e precipitação pluviométrica inferior a 1300mm anuais (Moreno, 1961).

Ao chegarem ao laboratório, os animais eram submetidos a um choque hiposmótico (água destilada) durante 24 horas, para eliminar possíveis parasitas e limpar seu conteúdo estomacal. Em seguida, os caranguejos eram aclimatados ao laboratório por um período de 15 dias, mantidos em aquários com salinidade entre 20‰, temperatura entre 20-25 °C, fotoperíodo natural 12h/12h de claro/escuro, aeração constante e alimentados com uma dieta rica em proteínas (grupo RP) ou rica em carboidratos (grupo RC). A dieta RP era constituída de carne bovina crua e a dieta RC de arroz cozido. Os caranguejos eram alimentados “ad libitum” diariamente entre às 16 e 17h. Conforme análise realizada pelo Dr. Crystoph Bernasiuk, do Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul o valor calórico das dietas administradas é semelhante (Tabela 1). Após o período de aclimação, iniciavam-se os procedimentos específicos para cada experimento.

Tabela 1: Composição das dietas administradas ao caranguejo *Chasmagnathus granulata*. Os valores relativos de cada item estão expressos em porcentagem e os valores calóricos totais estão expressos em cal/100g.

	Dieta RC	Dieta RP
Proteínas	3,34	21,59
Gorduras	0,45	6,71
Fibras	0,30	0,31
Cinzas	0,02	0,35
Carboidratos	34,56	0,03
Valor Calórico Total	155,65	146,87

2. Procedimentos experimentais

2. A. Efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de carboidratos, de proteínas e de lipídeos totais

Para o estudo do efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de glicogênio, de proteínas e de lipídeos totais, foram utilizados somente animais alimentados com dieta RP os quais foram divididos em três grupos: alimentados (controle), jejum e realimentados. No grupo controle, os animais receberam a dieta regularmente durante todo o período experimental. No grupo jejum, após o período de aclimatação, os caranguejos eram isolados em gaiolas individuais e permaneciam sem alimento durante 3 semanas. Os animais do grupo realimentado, após o período de jejum (3 semanas), eram novamente alimentados *ad libitum* com carne bovina durante 48h. Os experimentos eram realizados com os três grupos experimentais no mesmo dia.

2. A. a Estudo *in vivo*

Animais dos três grupos experimentais (alimentado, jejum e realimentado) eram colocados em gaiolas individuais numeradas 24h antes de cada experimento, a fim de evitar o possível estresse causado pela manipulação. Neste momento, uma primeira amostra de hemolinfa era coletada na articulação das quelas, utilizando-se como anti-coagulante oxalato de potássio 10%. Após 24 horas, os caranguejos receberam uma injeção de 1 μ Ci de D-glicose-U-C¹⁴ (Amersham International 283mCi/mmol) diluída em 100 μ l de solução Pantin (1948) pH 7,8, ou de 1 μ Ci de D-glicina-U-C¹⁴ (Amersham International 114mCi/mmol) diluída também em solução Pantin (1948) pH 7,8. As injeções eram aplicadas na articulação do quelípede direito. Após um intervalo de 4h, os animais eram crioanestesiados e amostras de hemolinfa, hepatopâncreas, brânquias totais e músculo (das quelas) foram coletadas e imediatamente iniciadas as determinações bioquímicas. Esses experimentos foram repetidos três vezes, com 3 animais por grupo.

Nos animais que receberam a injeção de D-glicose-U-C¹⁴, foram determinados: os valores de glicose e radioatividade total hemolinfáticos; a incorporação do C¹⁴ da glicose em glicogênio no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias; e a incorporação em lipídeos totais no músculo e no hepatopâncreas. Após a administração da D-glicina-U-C¹⁴, amostras de hepatopâncreas, de brânquias e de músculo foram utilizadas para a determinação da incorporação do C¹⁴ da glicina em glicogênio e em proteínas totais. Nas amostras de hemolinfa foram determinados os valores totais de radioatividade circulantes.

2. A. b Estudo *in vitro*

Para os estudos *in vitro*, no dia do término do período de tratamento dos grupos experimentais (alimentados, jejum e realimentados), eram coletadas amostras de 30 a 40

mg dos tecidos: hepatopâncreas, músculo das quelas e brânquias, as quais eram colocadas em tubos tipo Eppendorf de fundo arredondado (capacidade para 2ml) contendo 500 μ l de solução Pantin (1948) gelada, pH 7,8, acrescida de 5mM de D-glicose (Sigma) mais 0,2 μ Ci de D-glicose-U-C¹⁴ ou 5mM de D-glicina (Sigma) mais 0,2 μ Ci de D-glicina-U-C¹⁴. Após, os tecidos eram aerados por 30 segundos com uma mistura de O₂:CO₂ (95:5 v/v) e incubados em banho metabólico sob agitação constante.

Baseados em resultados prévios de nosso laboratório (Oliveira, 1998) foi escolhido o tempo de 120 minutos de incubação para o estudo de síntese de glicogênio-C¹⁴ a partir de D-glicose-U-C¹⁴. Para o experimentos sobre a incorporação do C¹⁴ da glicina em glicogênio foi realizada uma curva de tempo (Figura 1) utilizando-se os três tecidos e estabelecendo o período de 240 minutos para a incubação.

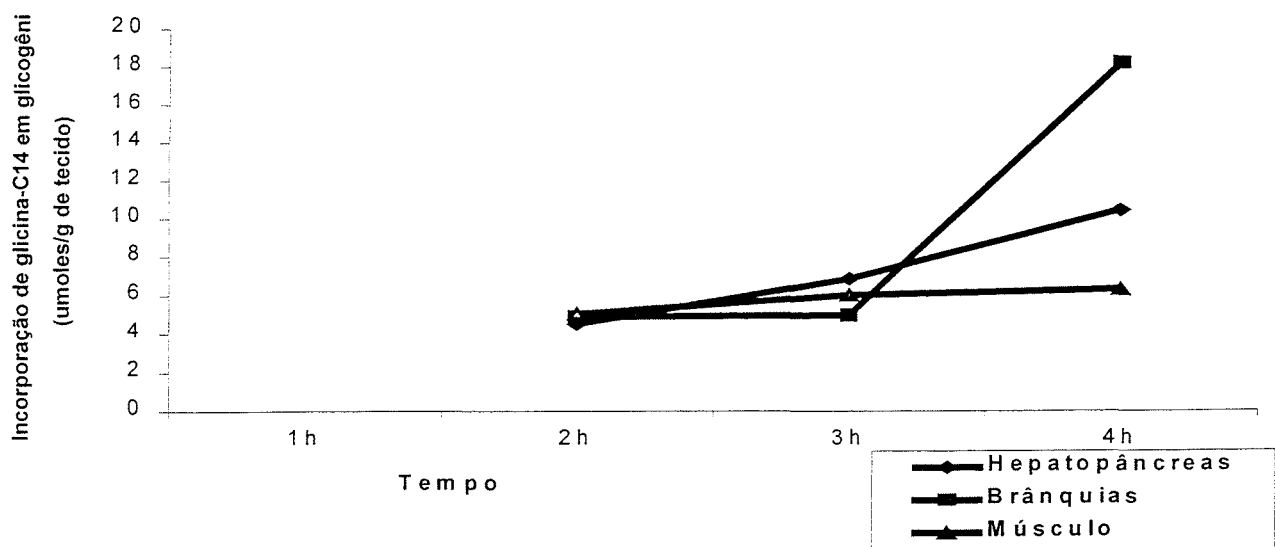


Figura 1: Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a incorporação do C¹⁴ da glicina em glicogênio no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados, em jejum ou realimentados. Os valores representam as médias \pm erro padrão da média de um experimento. O número amostral foi de 3 por grupo.

Após o período de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, sendo logo após iniciadas as determinações bioquímicas.

Estes experimentos foram repetidos três vezes, sempre com um número amostral de três caranguejos e as dosagens foram realizadas em duplicata.

2.B. Efeito da ablação bilateral do pedúnculo ocular sobre a adaptação ao estresse hiposmótico

Para o estudo do efeito da ablação do pedúnculo ocular sobre a adaptação ao estresse hiposmótico, foram utilizados caranguejos alimentados com as dietas RP ou RC intactos ou apedunculados. Depois de aclimatados por 15 dias às dietas e à salinidade de 20‰, os animais eram transferidos para aquários com água destilada e aeração constante onde permaneciam por um período 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 72 a 144 horas. A cirurgia de ablação dos pedúnculos oculares era realizada previamente (48h) ao início do estresse hiposmótico. A primeira amostra de hemolinfa era coletada antes da apedunculação. Antes de iniciar o estresse hiposmótico, 3 animais dos grupos intactos e apedunculados eram sacrificados para a determinação dos parâmetros bioquímicos iniciais (grupo 0h). Posteriormente, grupos de 3 animais eram removidos após 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 72 e 144 horas. Durante o período de estresse hiposmótico os caranguejos não eram alimentados. Os experimentos até 24h foram repetidos três vezes e os de tempos mais longos foram repetidos duas vezes.

Em um experimento piloto, os valores de glicose hemolinfática e os de glicose livre e de glicogênio no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo da quela foram medidos em animais intactos e apedunculados do grupo RP 7 e 15 dias após a cirurgia (tabela 2). Durante este período, os caranguejos eram alimentados normalmente. Tendo em vista que 15 dias após a apedunculação, os caranguejos encontravam-se em adiantado processo de

muda e que a maioria dos parâmetros obtidos estavam reduzidos em relação aos valores iniciais e em relação aos animais intactos, optou-se por iniciar o estresse hiposmótico dois dias após a cirurgia.

Tabela 2: Níveis de glicose e glicogênio em animais intactos e apedunculados 7 e 15 dias após a cirurgia, alimentados com a dieta RP. Os valores correspondem a média \pm erro padrão e o número amostral está entre parênteses. Os resultados de glicose hemolinfática estão expressos em mg/dl; os valores de glicose livre tecidual e de glicogênio estão expressos em mg/g de tecido. GL- glicose livre, GE- glicogênio.

	Intactos (7d)	Apedunculados (7d)	Apedunculados(15d)
Glicose Hemolinfa	10,39 \pm 1,6(5)	3,06 \pm 0,5 (4)	4,52 \pm 1,6 (4)
GL Hepatopâncreas	13,52 \pm 0,9 (4)	6,38 \pm 1,1 (4)	8,51 \pm 2,7 (4)
GL Brânquias. Anteriores	3,45 \pm 0,4 (3)	3,68 \pm 0,9 (4)	1,58 \pm 0,5 (4)
GL Brânquias Posteriores	7,32 \pm 1,5 (4)	4,01 \pm 1,2 (3)	1,85 \pm 0,3 (4)
GL Músculo	13,52 \pm 0,9 (4)	6,38 \pm 0,5 (4)	8,51 \pm 2,7 (4)
GE Hepatopâncreas	2,97 \pm 0,4 (4)	1,04 \pm 0,2 (4)	1,35 \pm 0,5 (4)
GE Brânquias Anteriores	3,34 \pm 0,5 (4)	2,66 \pm 0,4 (3)	0,99 \pm 0,3 (4)
GE Brânquias Posteriores	4,57 \pm 1,0 (3)	5,38 \pm 1,5 (3)	1,93 \pm 0,5 (4)
GE Músculo	0,8 \pm 0,11 (4)	0,41 \pm 0,04(4)	0,32 \pm 0,11(3)

2. B. a Procedimento cirúrgico

Para a ablação dos pedúnculos oculares, os caranguejos eram crioanestesiados por apenas 5 minutos e os pedúnculos removidos com uma tesoura e imediatamente era feita a cauterização da cicatriz (termocautério MODELO BC-160 WEM EQUIPAMENTOS) para conter a hemorragia. Após permanecerem em ambiente seco por alguns minutos, os animais retornavam para os aquários. No dia seguinte à cirurgia, os animais apedunculados eram alimentados no mesmo horário que os intactos.

2. C. Incubação dos pedúnculos oculares

A técnica para a incubação dos pedúnculos oculares foi desenvolvida a partir dos procedimentos descritos por Fingerman e Nagabushanam (1992) para o lagostim

Procambarus clarkii. No dia de cada experimento, no início da manhã, animais intactos previamente mantidos com as dietas RP ou RC eram apedunculados segundo a técnica anteriormente descrita. Os pedúnculos eram mantidos por alguns minutos em um placa de Petry forrada com papel de filtro embebido em solução salina gelada. Em seguida, era realizado um corte perpendicular na região mediana ventral dos pedúnculos que eram transferidos para Erlenmeyers com 2,0ml de solução salina, aerados por 30 segundos com uma mistura de O₂:CO₂ (95:5 v/v) e incubados no escuro em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante, a 25 °C durante 4 horas. Nos animais alimentados com a dieta RC foram testados meios com 4 pedúnculos enquanto nos grupos RP foram testados os efeitos de meios contendo 4, 8 e 12 pedúnculos.

A solução salina utilizada foi adaptada ao caranguejo *C. granulata* a partir daquela descrita por Loret e cols. (1989). A concentração de NaCl foi reduzida para 300mM, a fim de tornar a solução isosmótica (750 mOsm/l) em relação a hemolinfa do *C. granulata*. As medidas da osmolaridade das soluções e de amostras de hemolinfa do *C. granulata* (Tabela 3) foram realizadas, gentilmente, pelo Dr. Jarbas Domingues de Oliveira, em um osmômetro de congelamento Knauer (Osmometer Automatic Digital), pertencente ao Laboratório de Bioquímica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Tabela 3: Comparação entre os valores de osmolaridade da hemolinfa de 5 exemplares de *Chasmagnathus granulata* mantidos na condição padrão de nosso laboratório com a osmolaridade das soluções salinas utilizadas nos experimentos. Os valores estão expressos em mOsm/l.

	Osmolaridade
Hemolinfa	753,2 ± 10,04 (5)
Salina Normal	757,0

Após o período de 4 horas, a incubação dos diferentes meios era interrompida em banho de gelo. Uma parte do meio de incubação (0,1ml/caranguejo) era injetada na articulação do quelípede direito em animais intactos e apedunculados alimentados com ambas as dietas e aclimatados às mesmas condições já descritas para o experimento anterior. Amostras de hemolinfa eram coletadas 30, 60, 90 e 120 minutos após.

2.D Administração de monoaminas

2.D.a Serotonina

Em animais intactos, alimentados com as dietas RP ou RC, foram injetadas (na articulação do quelípede direito) 3 diferentes concentrações de serotonina (5-hydroxytryptamine creatine sulfate complex -Sigma): $2,6 \times 10^{-8}$ moles/caranguejo; $2,6 \times 10^{-7}$ moles/caranguejo, $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo diluídas em 100 μ l solução salina normal. Aos animais apedunculados, submetidos à duas diferentes dietas, foram administrados 100 μ l da dose de $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo. Além dos animais apedunculados 2 dias (48h) antes do experimento, foram utilizados animais apedunculados a 7 e 9 dias do grupo RP e apedunculados a 6 e 8 dias no grupo RC. Nesses experimentos, a primeira amostra de hemolinfa foi coletada no início da manhã, 4h antes da administração da bioamina, no momento em que os caranguejos eram acondicionados em gaiolas numeradas para sua posterior identificação. As amostragens subsequentes de hemolinfa foram colhidas 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de serotonina

2.D.b Dopamina

Em animais intactos alimentados com as dietas RC ou RP, foram injetadas 3 concentrações de dopamina (3,4 Dihydroxyphenylethylamine hydrochloride- Sigma): $5,3 \times 10^{-8}$ moles/caranguejo; $5,3 \times 10^{-7}$ moles/ caranguejo e $5,3 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo diluídas em 100 μ l de salina normal. Nos animais apedunculados (48h) submetidos às dietas RC ou RP foi administrada a dose de $5,3 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo. Nesses experimentos, os procedimentos para as coletas de hemolinfa foram iguais aqueles descritos para a serotonina.

3. Determinações bioquímicas

3. a. Determinação da glicose hemolinfática

A concentração de glicose hemolinfática foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase com o “kit” Glicose Enz-Color e os resultados expressos em mg/dl.

3. b. Determinação de glicose livre nos tecidos

Os níveis de glicose livre dos diferentes tecidos foram determinados conforme método descrito por Carr e Neff (1984). As amostras de tecido foram pesadas e homogeneizadas com Ultra-Turrax em uma solução de citrato de sódio 100mM, fervidas por 10 minutos, agitadas, resfriadas a temperatura ambiente e mantidas a -4°C por no máximo uma semana, até a determinação da glicose. Para separação da fração lipídica, as amostras eram misturadas a uma solução de clorofórmio-metanol na proporção de 2:1 (v/v) e centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm. A concentração de glicose foi determinada pelo método da

glicose-oxidase (“kit” Enz-Color”) na fração superior obtida da centrifugação. Os resultados foram expressos em mg de glicose livre por g de peso úmido de tecido.

3.c. Isolamento e determinação da concentração de glicogênio nos tecidos

A extração de glicogênio foi realizada segundo o método de Van Handel (1965). As amostras de tecidos eram pesadas (50 a 100 mg) e digeridas em 2ml de KOH 30% em banho fervente durante 1 hora. Após o glicogênio era precipitado com etanol 98%, as amostras centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm e ressuspensas em água destilada. Este processo foi repetido por 3 vezes. O glicogênio foi determinado como glicose após hidrólise ácida. A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos foi expressa em mg/g de tecido úmido.

3.d. Determinação da radioatividade total na hemolinfa

Para a determinação dos níveis totais de radioatividade, amostras de hemolinfa eram centrifugadas a 20000rpm durante 5 minutos e alíquotas de 20 μ l do sobrenadante resultante eram colocadas em “viais” contendo 5ml de coquetel de cintilação (Tolueno-Triton, 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%). Os resultados foram expressos em DPM/100 μ l de hemolinfa.

3.e. Determinação do glicogênio-C¹⁴

Nos estudos *in vivo* a extração do glicogênio-C¹⁴ foi realizada segundo o método acima descrito. No final do processo, o glicogênio precipitado era ressuspensão em 5 ml de água destilada e dialisado contra água por 24 horas. A seguir, do conteúdo de cada saco de

diálise era retirada uma amostra de 500 µl e adicionada ao coquetel de cintilação (Tolueno-Triton X-100, 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%). Os resultados foram expressos em DPM/ g de tecido.

Para os estudos *in vitro*, o isolamento e a determinação do glicogênio- C^{14} formado a partir de D-glicose- $U-C^{14}$ ou D-glicina- $U-C^{14}$ foram realizados segundo o método descrito por Thomas e cols. (1968). Após a incubação, os tecidos eram lavados por três vezes em Pantin gelado, secos em papel de filtro, colocados em KOH (0,5N) e fervidos (80°C) durante uma hora para a digestão. Para a desproteínização e a neutralização das amostras digeridas era adicionada uma solução de TCA 30% mais ácido clorídrico 1N na proporção de 2:1 (v/v), agitadas e centrifugadas por 10 min a 10000rpm. Um volume de 30µl do sobrenadante foi aplicado sobre papel Wattman 3MM (2cm x2cm). Para a precipitação do glicogênio- C^{14} , os filtros foram lavados por 2 vezes em álcool etílico (66%), a primeira por 30 minutos e a segunda por 15 minutos e após secos a temperatura ambiente. Como branco utilizava-se um pedaço igual de papel de filtro, que sofria o mesmo procedimento, mas sem amostra de tecido. Quando secos, os filtros eram colocados em 5ml de coquetel de cintilação (Tolueno-Triton, 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%). Os resultados foram expressos em µg de D-glicose- $U-C^{14}$ incorporados em glicogênio por g de tecido por tempo de incubação.

3. f. Determinação de lipídeos-totais- C^{14}

A extração dos lipídios totais foi realizada segundo o método de Folch e cols. (1957). Após, 2ml da fase clofórmica das amostras de hepatopâncreas (300 a 400mg) e de músculo (400 a 500mg) eram colocados em um frasco de contagem juntamente com H_2O_2

30% (200µl para cada 100mg de tecido), a fim de diminuir a forte coloração amarela proveniente dos pigmentos dos tecidos. As amostras eram mantidas descobertas durante uma noite a temperatura ambiente, permitindo a evaporação do clorofórmio. No dia seguinte, as amostras eram suavemente agitadas após o acréscimo de 10ml de líquido de cintilação Tolueno-PPO (5g de PPO em 1l de Tolueno). Somente após 24h de repouso, era medida a radioatividade. Os resultados foram expressos em dpm/g de tecido.

3.g. Determinação de proteínas - C¹⁴

As proteínas do músculo (400 a 500mg), do hepatopâncreas (100 a 300mg) e das brânquias (50 a 100mg) foram processadas segundo o método descrito por Da Silva e Migliorini (1990). O precipitado final foi dissolvido em sódio lauril sulfato (SDS Quimis) 10% com 10mM de EDTA (ácido etileno diamino tetra acético da Sigma), foi utilizado 1 ml de cada amostra para as medidas de radioatividade em coquetel de cintilação (Tolueno-Triton X-100, 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%). Os resultados foram expressos em DPM/ g de tecido.

3.h. Determinação da conversão do ¹⁴C da glicina em ¹⁴C-glicose

A incubação dos tecidos para a formação de glicose a partir de D-glicina-U-C¹⁴ seguiu o mesmo protocolo já descrito para a síntese de glicogênio, porém a glicose-C¹⁴ era determinada no meio de incubação. Após o período de incubação de 240 minutos, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 3000rpm, o sobrenadante desproteinizado com Ba(OH)₂ saturado e ZnSO₄ (2%), sendo novamente centrifugado por 10 min. a 3000rpm. O sobrenadante, resultante desta segunda centrifugação, foi utilizado para a determinação de

glicose-C¹⁴ por cromatografia em camada fina segundo o método descrito por Oliveira e da Silva (1997). Como solução carreadora foram utilizados n-butanol: álcool etílico (95%):ácido acético (5,4%) na proporção de 250:158:92 (v/v/v). As manchas foram reveladas com uma solução de álcool etílico (95%):ácido sulfúrico concentrado:anilaldeído na proporção de 18:1:1 (v/v/v), após eram raspadas com uma espátula e colocadas diretamente em frascos contendo 5ml de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%). As amostras eram mantidas durante 24 horas sob refrigeração (4-7°C) para a sílica dissolver. Na medida da radioatividade foi utilizada uma curva de correção para DPM. Os resultados foram expressos em μmol de D-glicina-U-C¹⁴ convertidos em glicose-C¹⁴ por g de tecido por tempo de incubação.

Em todos os experimentos a radioatividade foi medida em um espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac com 95% de eficiência.

4. Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos (\pm) o erro padrão da média (EPM). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois pontos foi feita pelo teste t de Student para dados não pareados e para a comparação entre vários grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de Duncan. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas se os valores de probabilidade fossem iguais ou menores que 0,05.

Os cálculos estatísticos foram realizados com o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) compatível com Windows 95 (versão 3.0).

RESULTADOS

I. EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE A SÍNTESE DE CARBOIDRATOS, DE LIPÍDEOS TOTAIS E DE PROTEÍNAS

A. Procedimentos *in vivo*

A.a. Estudo com glicose-U-¹⁴C

A.a.1. Radioatividade total na hemolinfa

A medida da radioatividade total na hemolinfa de caranguejos alimentados, em jejum e realimentados 1 e 4h após a injeção de glicose-U-C¹⁴ pode ser vista na figura 2. Dos grupos estudados, o grupo alimentado foi o que apresentou menor ($p < 0,05$) captação de glicose 1h após a injeção. Contudo, 4h após os níveis de radioatividade hemolinfáticos nos três grupos são equivalentes ($p > 0,05$).

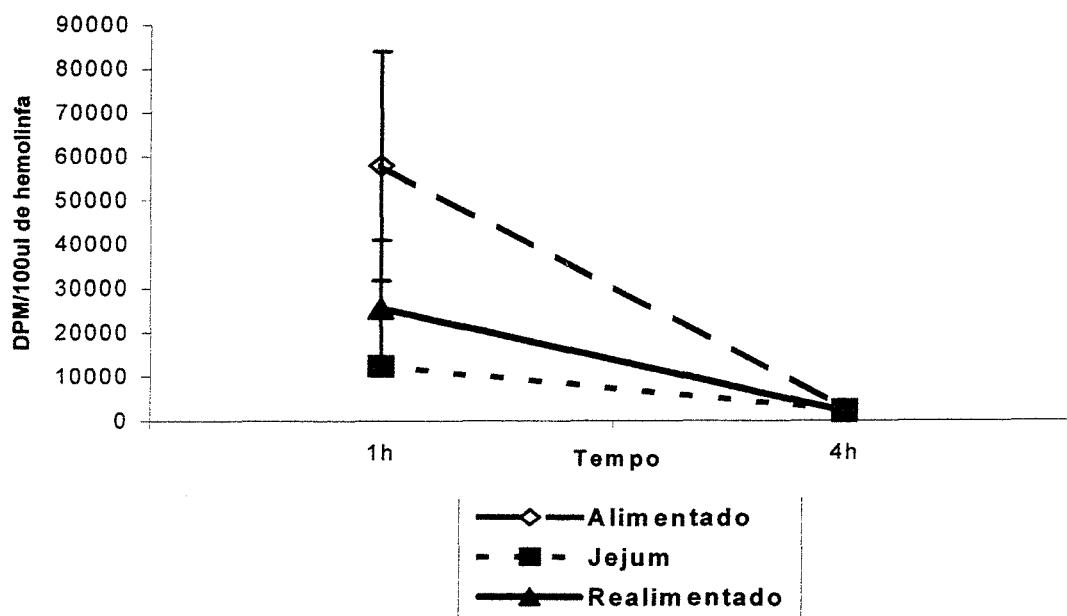


Figura 2: Radioatividade total na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados, em jejum e realimentados 1 e 4 h após a administração de glicose-U-C¹⁴. Os dados representam a médias ± EPM de três experimentos e o número amostral variou entre 3 e 12 por grupo.

A.a.2. Glicose hemolinfática

Os resultados da concentração de glicose na hemolinfa dos grupos alimentado, em jejum e realimentado estão representados na figura 3. Apesar do jejum de três semanas e da realimentação por 48 horas, não foram constatadas variações significativas dos níveis de glicose na hemolinfa dos animais em restrição alimentar ou realimentados, quando comparados com os valores obtidos nos caranguejos alimentados ($p > 0,05$).

Comparando-se os valores de glicose na hemolinfa 24 horas antes do experimento com aqueles 4 horas após a administração da glicose- $U-^{14}C$, não foram constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

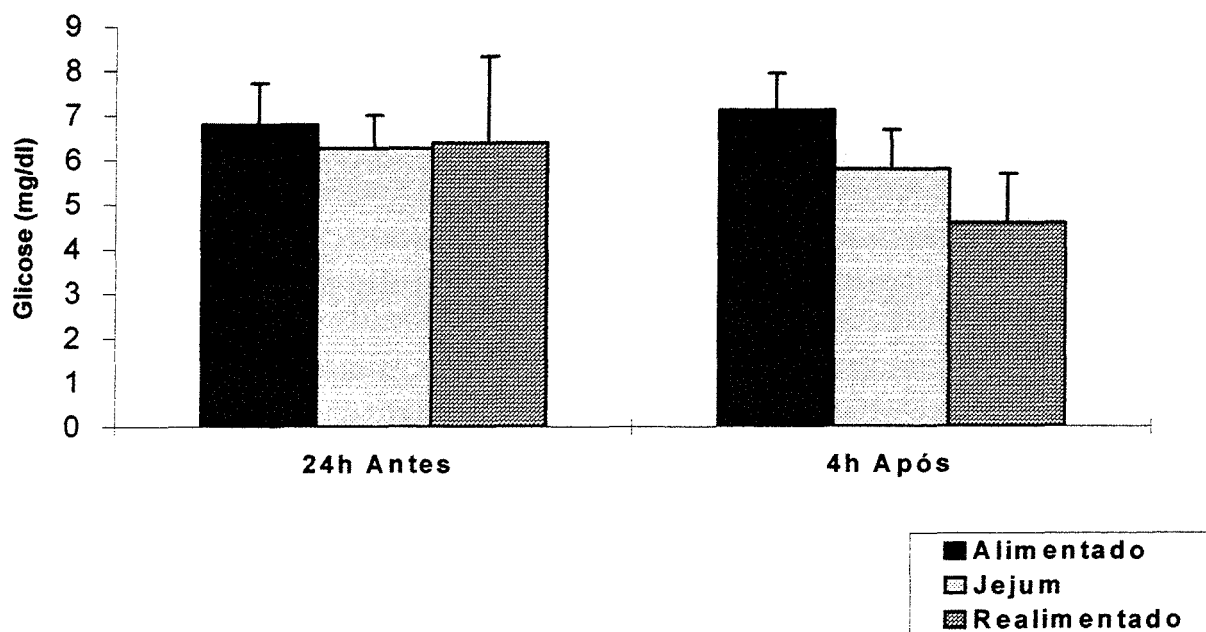


Figura 3.: Concentração de glicose na hemolinfa antes do experimento e 4h após a administração de glicose- $U-^{14}C$ em *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 13 e 15 animais por grupo e as barras verticais representam os erros padrões.

A.a.3. Síntese de glicogênio-C¹⁴

Comparando-se a incorporação do ¹⁴C da glicose em glicogênio (Figura 4) nos três tecidos estudados, constata-se que no músculo os valores de síntese de ¹⁴C-glicogênio foram significativamente ($p < 0,05$) menores que os do hepatopâncreas e das brânquias. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na síntese de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo entre os três tratamentos experimentais ($p > 0,05$). Contudo, nas brânquias os valores de incorporação do ¹⁴C da glicose em glicogênio foram cerca de 50% ($p < 0,05$) menores no período de realimentação que os dos animais alimentados.

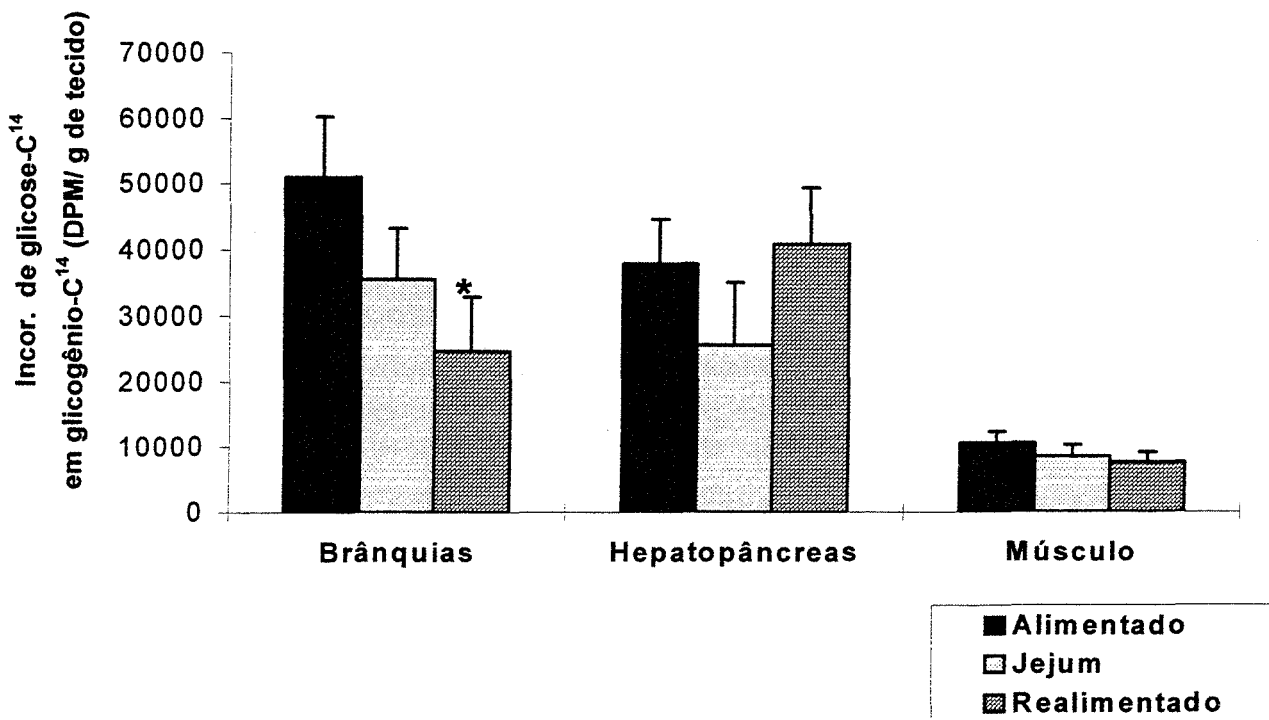


Figura 4: Incorporação do C¹⁴ da glicose em glicogênio nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 7 e 10 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

A.a.4. Síntese de lipídeos totais-C¹⁴

Os valores de incorporação do C¹⁴ da glicose em lipídeos totais foram determinados no hepatopâncreas (Figura 5 A) e no músculo (Figura 5B). Os valores de incorporação do ¹⁴C da glicose em lipídeos totais no músculo foram 10 vezes menores que no hepatopâncreas (p<0,05).

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na capacidade de síntese de lipídeos a partir de ¹⁴C-glicose no hepatopâncreas entre os animais alimentados e os em restrição alimentar (p>0,05). Nos caranguejos realimentados, contudo, a incorporação do ¹⁴C da glicose foi 2,5 vezes maior (p<0,05) que a dos animais em jejum e alimentados.

Não foram verificadas diferenças significativas (p>0,05) na capacidade de síntese de lipídeos totais no músculo entre os animais alimentados, em jejum e realimentados.

A.b. Estudo com glicina-U- C¹⁴

A.b.1. Radioatividade total na hemolinfa

A medida da radioatividade total na hemolinfa de caranguejos alimentados, em jejum e realimentados 1 e 4h após a injeção de glicina-U-C¹⁴ pode ser vista na figura 6. Dos grupos estudados, o jejum foi o que apresentou maior (p>0,05) captação de glicina 1h após a injeção. Contudo, 4h após os níveis de radioatividade hemolinfáticos nos três grupos são equivalentes.

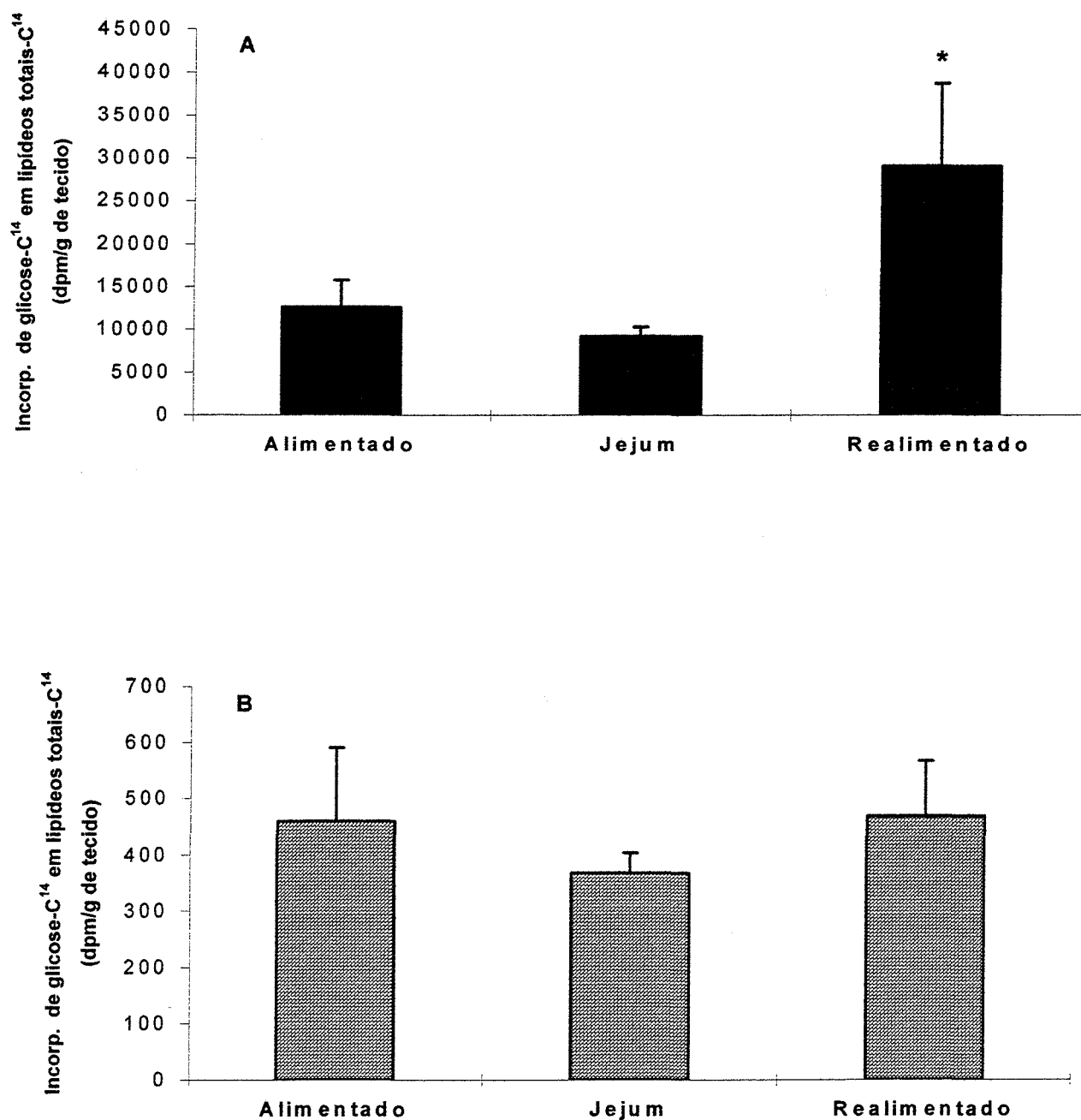


Figura 5. Incorporação de glicose-U-C¹⁴ em lipídeos totais no hepatopâncreas (A) e no músculo (B) de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 8 e 11 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo jejum.

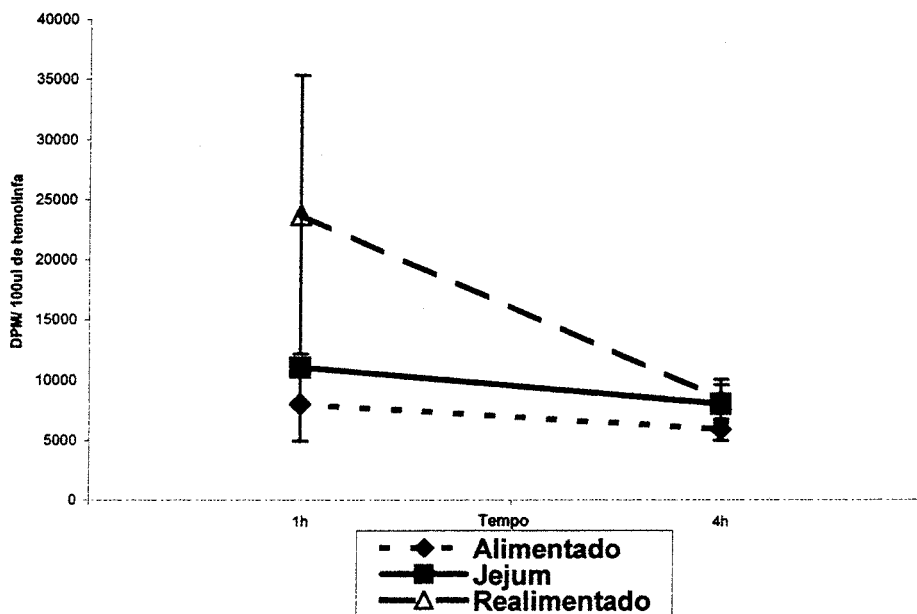


Figura 6: Radioatividade total na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados, em jejum e realimentados 1 e 4 h após a administração de glicina-U- C^{14} . Os dados representam a médias \pm EPM de três experimentos e o número amostral variou entre 3 e 12 por grupo.

A.b.2. Síntese de glicogênio- C^{14}

Os valores de incorporação do C^{14} da glicina em glicogênio no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo, em animais alimentados, em jejum e realimentados, podem ser vistos na figura 7. Nas brânquias e no hepatopâncreas, não foram observadas variações estatisticamente significativas, nos três grupos experimentais estudados ($p > 0,05$). No músculo, contudo, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores de síntese de glicogênio a partir de glicina-U- C^{14} após o jejum de três semanas. Comparando-se os valores de síntese de glicogênio entre os dois precursores (glicina-U- C^{14} e glicose-U- C^{14})

nos três tecidos e grupos experimentais estudados, constata-se uma maior ($p < 0,05$) capacidade de síntese a partir de glicose-U- C^{14} .

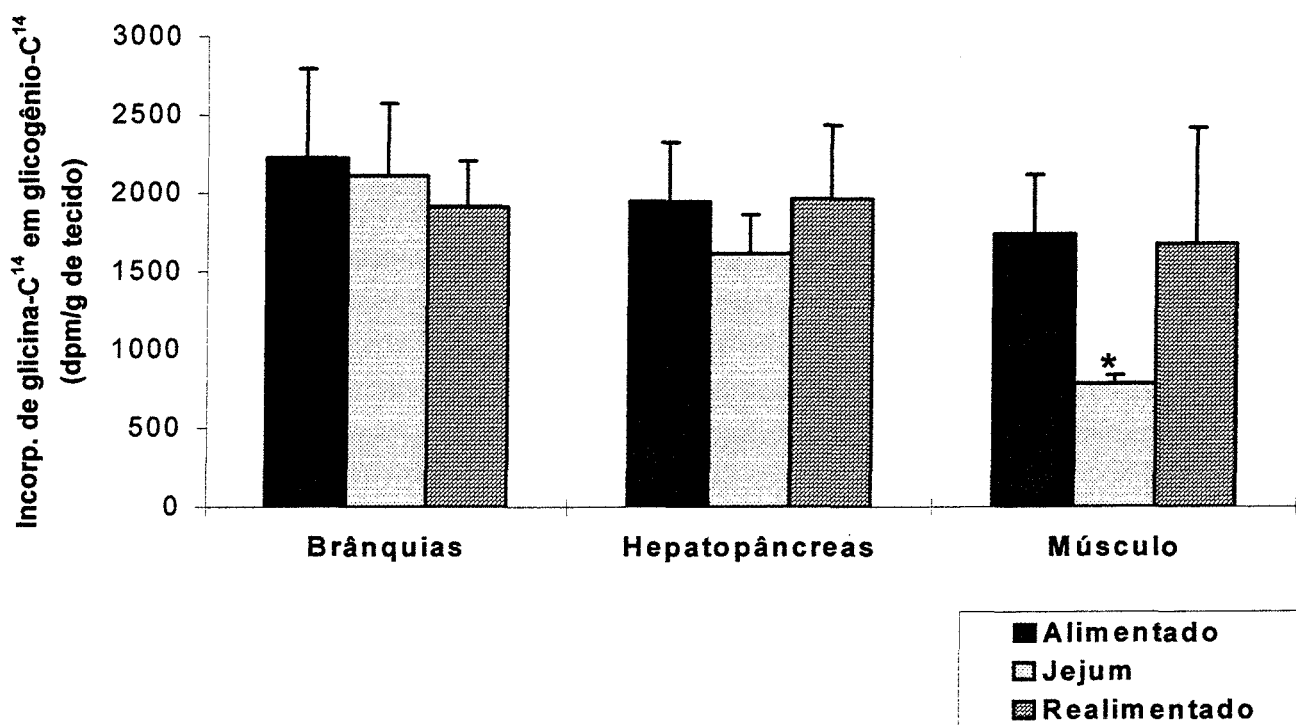


Figura 7: Incorporação do C^{14} da glicina em glicogênio nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 4 e 11 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

A.b.3. Síntese de proteínas - C^{14}

Os valores obtidos para a síntese de proteínas a partir de glicina-U- ^{14}C no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo de animais alimentados, em jejum e realimentados podem ser vistos na figura 8. Comparando-se a síntese de proteínas a partir de glicina-U- ^{14}C nas brânquias dos três grupos experimentais estudados, constata-se valores

de incorporação do ^{14}C da glicina significativamente ($p < 0,05$) maiores que os do hepatopâncreas.

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas na incorporação do ^{14}C da glicina em proteínas no hepatopâncreas e nas brânquias entre os três grupos experimentais estudados. Entretanto, no músculo, após o período de realimentação, ocorreu uma redução de cerca de 60% ($p > 0,05$) na capacidade de síntese de proteínas em relação ao grupo alimentado.

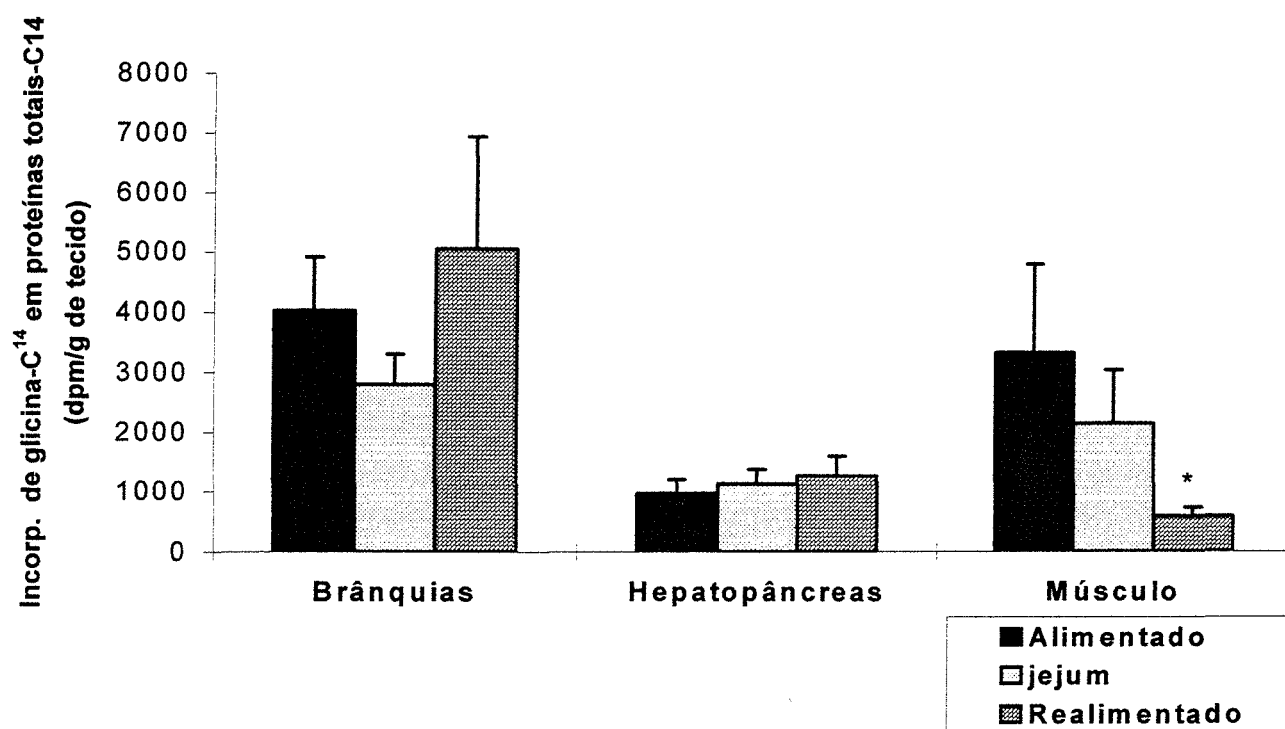


Figura 8: Incorporação do C^{14} da glicina em proteínas nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 5 e 11 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

B.Procedimentos *in vitro*

B.a. Estudo com glicose-U-¹⁴C

B.a.1. Síntese de glicogênio-C¹⁴

Os resultados *in vitro* da conversão de glicose-U-¹⁴C em glicogênio-C¹⁴ nas brânquias, no músculo e no hepatopâncreas, em animais em jejum, alimentados e realimentados, podem ser vistos na figura 9.

Comparando-se a incorporação do ¹⁴C da glicose em glicogênio nos três tecidos, constata-se que *in vitro*, assim como ocorreu *in vivo*, os valores de síntese de ¹⁴C-glicogênio foram significativamente ($p < 0,05$) menores no músculo quando comparados aqueles do hepatopâncreas e das brânquias.

Nos três tecidos estudados não foram verificadas variações significativas ($p > 0,05$) da incorporação do ¹⁴C da glicose em glicogênio entre os grupos alimentado, jejum e realimentado.

B.b. Estudo com glicina-U-¹⁴C

B.b.1. Síntese de glicogênio-C¹⁴

As variações na síntese de glicogênio-C¹⁴ no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias, no jejum e na realimentação podem ser vistas na figura 10. Nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo, a capacidade de síntese de glicogênio-C¹⁴ em animais em jejum e realimentados foi semelhante àquela dos animais alimentados ($p > 0,05$).

Dos tecidos estudados, as brânquias apresentaram maior capacidade de síntese de glicogênio-C¹⁴ a partir de glicina-C¹⁴ ($p < 0,05$).

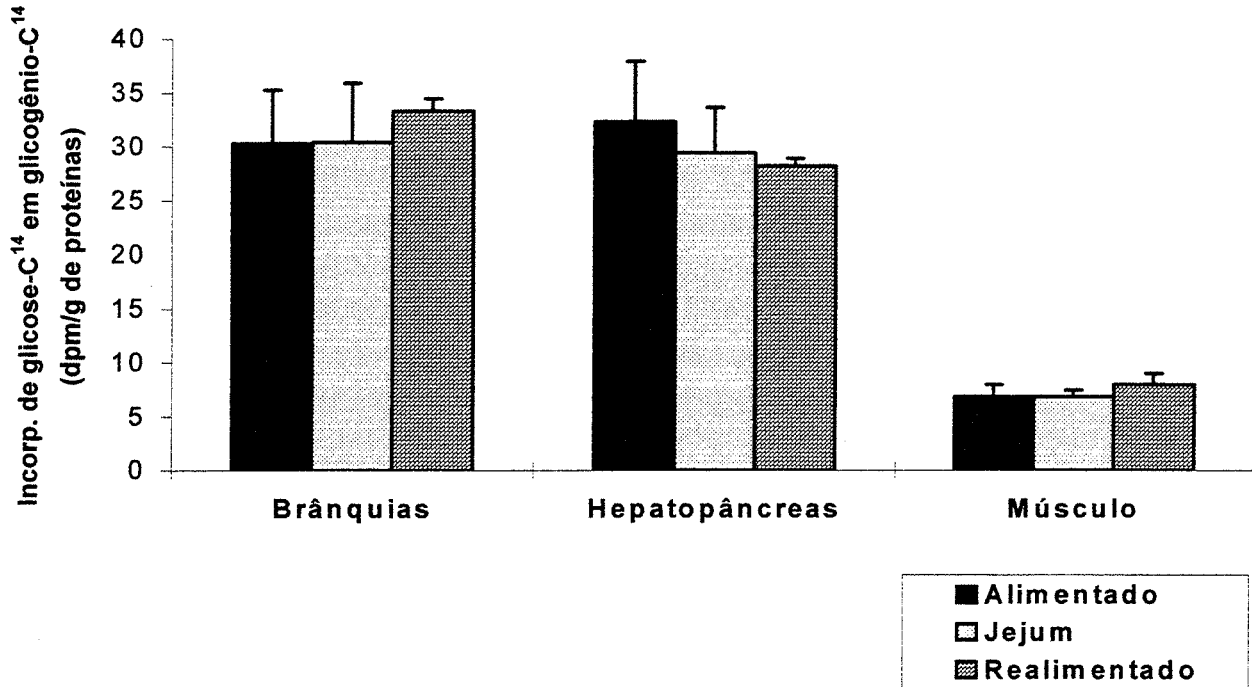


Figura 9: Incorporação do C^{14} da glicose em glicogênio *in vitro* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 7 e 9 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões.

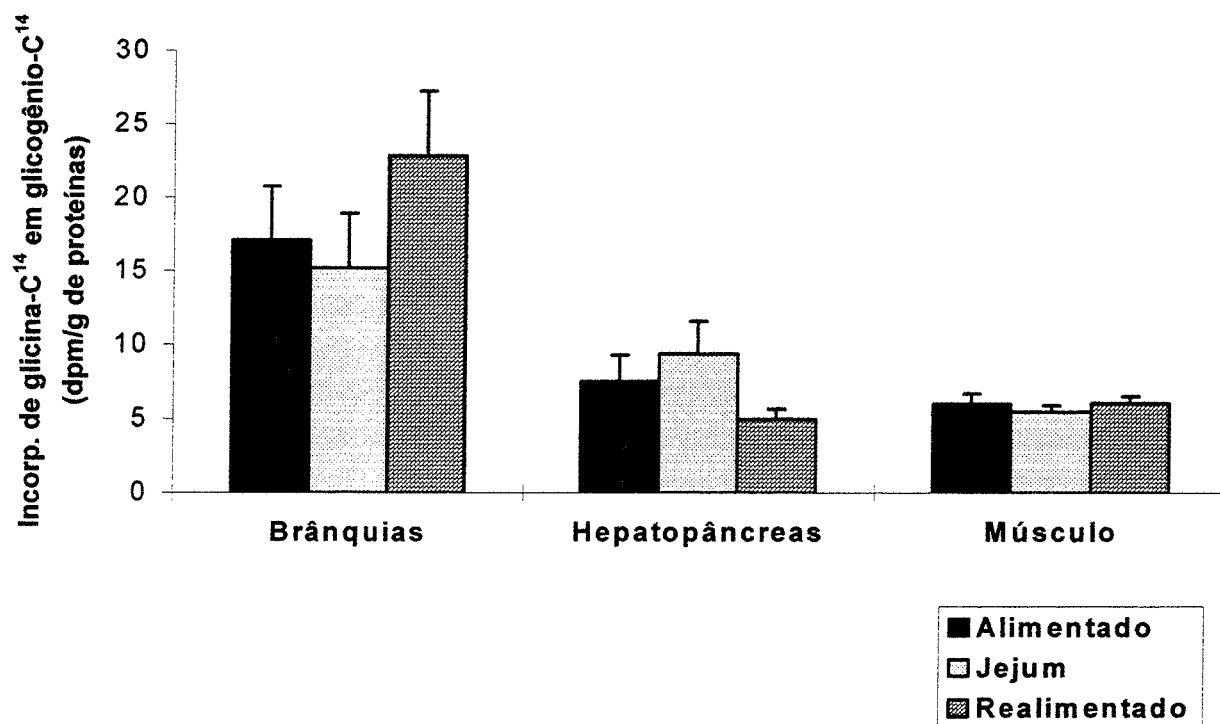


Figura 10: Incorporação do C^{14} da glicina em glicogênio *in vitro* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 7 e 12 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões.

B.b.2. Conversão do ^{14}C da glicina em ^{14}C -glicose

Os resultados da conversão de glicina- $\text{U-}^{14}\text{C}$ em glicose- ^{14}C no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo, em animais alimentados, em jejum e realimentados, podem ser vistos na figura 11. Nas brânquias e no hepatopâncreas, não foram constatadas variações significativas ($p > 0,05$) da capacidade gliconeogênica entre os grupos alimentado, em jejum

e realimentado. Já no músculo, a conversão do ^{14}C da glicina em glicose- ^{14}C aumentou em 2 vezes ($p < 0,05$) durante a realimentação.

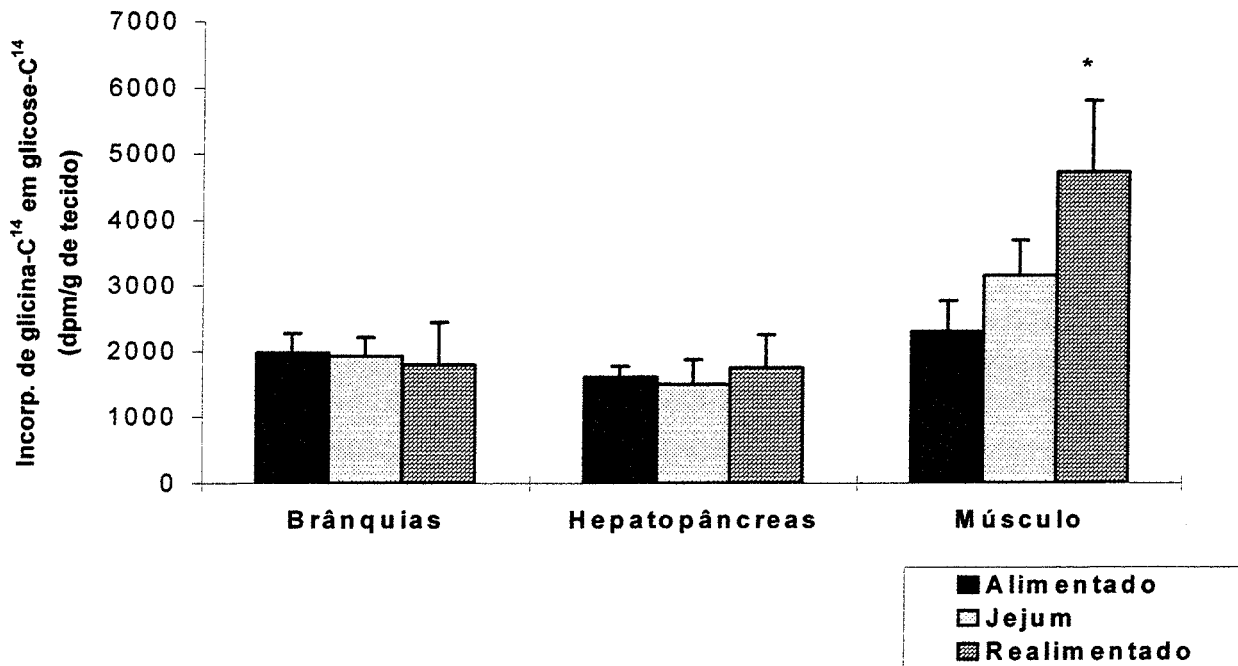


Figura 11: Incorporação do C^{14} da glicina em glicose *in vitro* nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados, submetidos a um período de 3 semanas de jejum ou realimentados durante 48 horas. Os valores representam as médias de 3 experimentos, o número amostral variou entre 9 e 12 por grupo e as barras verticais representam os erros padrões. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo alimentado.

II. EFEITO DA ABLAÇÃO DO PEDÚNCULO OCULAR SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DURANTE O PROCESSO DE ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE HIPOSMÓTICO

1. Concentração de glicose na hemolinfa

Nos animais alimentados com dieta RP (Figura 12A), dois dias após a ablação dos pedúnculos oculares a concentração de glicose na hemolinfa diminuiu 30% ($p < 0,05$) em relação aos valores pré - operatórios e dos animais controles. Os valores de glicose hemolinfática dos animais apedunculados permanecem significativamente menores que os dos animais intactos até o período de 3h de estresse hiposmótico ($p < 0,05$).

No grupo controle alimentados com dieta RP, às 6 horas de estresse, os valores de glicose hemolinfática diminuíram significativamente ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero, contudo, às 9h de estresse, os valores retornam aos níveis iniciais, se mantendo até o final do período de estresse estudado.

Nos animais apedunculados, não foram constatadas variações significativas nos níveis de glicose hemolinfática nas primeiras 9 horas de estresse hiposmótico. Contudo, às 12 horas ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$), retornando a valores semelhantes aos iniciais após 16 horas de estresse. A partir de então, os níveis tendem a se estabilizar.

Nos animais apedunculados alimentados com dieta RC (Figura 12B), dois dias após a ablação do pedúnculo ocular ocorreu uma redução de 60% ($p < 0,05$) dos níveis de glicose hemolinfática em relação aos valores pré - operatórios e dos animais controles.

A partir das 6 horas de estresse hiposmótico, verifica-se um aumento significativo dos valores de glicose na hemolinfa no grupo de animais apedunculados alimentados com a dieta RC ($p < 0,05$), atingindo às 12 horas níveis 3 vezes maiores que os iniciais (zero hora).

Às 16 horas de estresse osmótico, a concentração de glicose na hemolinfa começou a diminuir, contudo, os valores ainda foram significativamente ($p < 0,05$) maiores que os iniciais até às 24 horas, retornando a níveis semelhantes aos do tempo zero às 144 horas.

No grupo controle alimentado com a dieta RC, não foram constatadas variações significativas ($p < 0,05$) da concentração de glicose na hemolinfa nos tempos de estresse hiposmótico estudados. Contudo, às 20 horas os valores de glicose hemolinfática aumentaram cerca de 32% ($p > 0,05$), retornando a níveis 50% ($p > 0,05$) menores que os iniciais às 144 horas de estresse osmótico. Somente foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de animais intactos e apedunculados RC às 24h de estresse hiposmótico.

Comparando-se os níveis de glicose na hemolinfa dos animais intactos mantidos com as dietas RC ou RP, constatam-se valores de glicose cerca de 100% ($p < 0,05$) mais elevados nos caranguejos alimentados com a dieta RC.

RESULTADOS

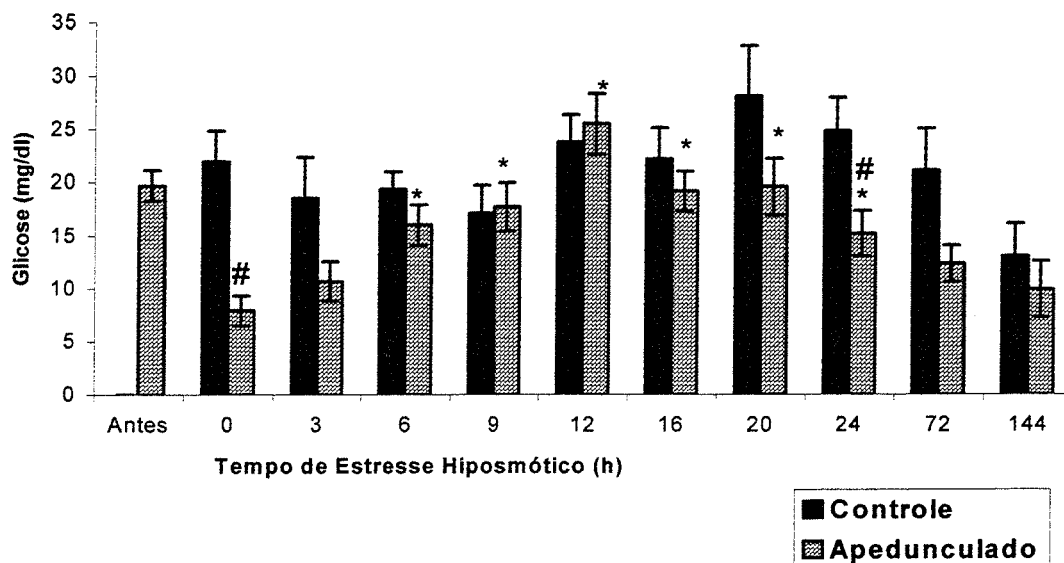
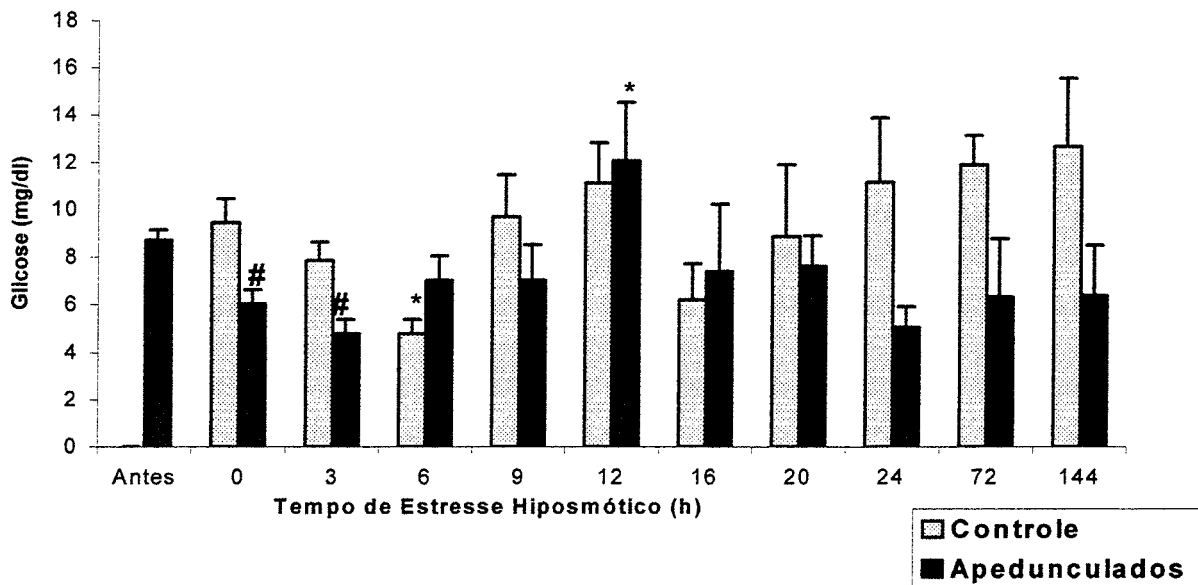


Figura 12: Níveis de glicose na hemolinfa ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença significativamente ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-24 animais por tempo de estresse.

2.a. Concentração de glicogênio no hepatopâncreas

Nos animais intactos alimentados com dieta RP (Figura 13A), durante o estresse hiposmótico, observa-se uma redução significativa ($p < 0,05$) dos valores de glicogênio hepatopancreático entre às 16 e 72 horas de estresse, retornando a concentração inicial às 144 horas. Nos níveis de glicogênio no hepatopâncreas dos animais apedunculados, não foram verificadas diferenças significativas ao longo do estresse hiposmótico. Comparando-se os níveis de glicogênio no hepatopâncreas dos animais intactos e apedunculados ao longo do estresse osmótico, não foram verificadas variações significativas entre estes dois grupos.

Nos animais intactos alimentados com dieta RC (Figura 13B), os níveis de glicogênio diminuem significativamente ($p < 0,05$) em relação aos valores iniciais às 9, 72 e 144 horas de estresse hiposmótico. Nos animais apedunculados mantidos com a dieta RC, os tempos de estresse osmótico estudados não alteraram significativamente a concentração de glicogênio hepatopancreático. Às 72 e 144 horas, porém, os valores de glicogênio no hepatopâncreas diminuíram cerca de 50% ($p > 0,05$) em relação aos níveis do tempo zero.

No grupo de animais alimentados com a dieta RC, os valores de glicogênio no hepatopâncreas foram duas vezes maiores ($p < 0,05$) que os da dieta RP. Dois dias após a ablação do pedúnculo ocular, o valor de glicogênio no hepatopâncreas dos animais operados mantidos com as dietas RP ou RC foram semelhantes aqueles dos animais intactos alimentados com as mesmas dietas.

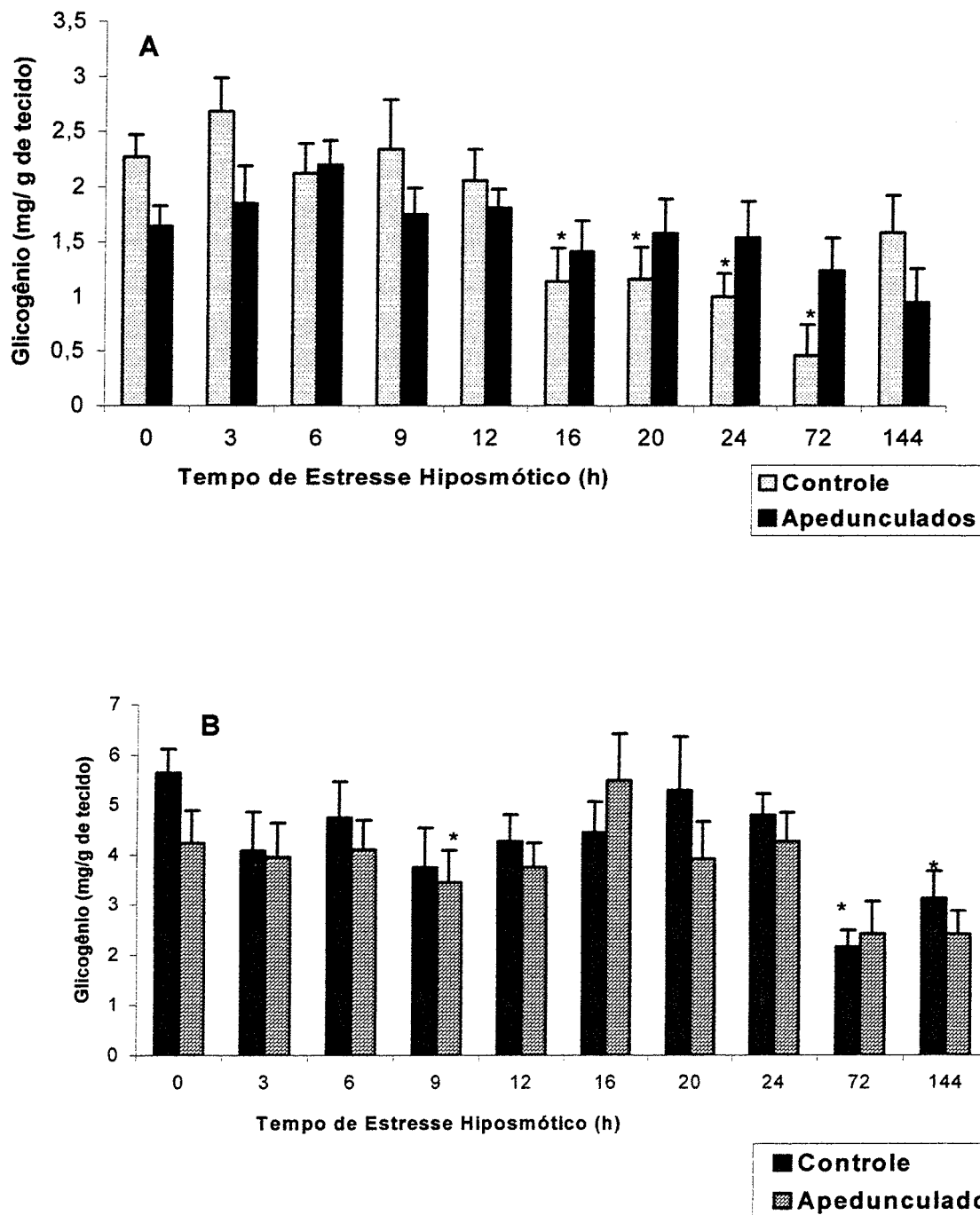


Figura 13: Níveis de glicogênio no hepatopâncreas ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

2.b. Concentração de glicose livre no hepatopâncreas

Nos animais intactos alimentados com dieta RP (Figura 14A), a concentração de glicose livre diminui significativamente ($p < 0,05$) a partir das 16 horas de estresse hiposmótico, atingindo níveis 4 e 2 vezes menores que os iniciais às 72 e 144 horas, respectivamente. Nos animais apedunculados ocorreram dois picos de aumento da concentração de glicose livre: um às 3 horas ($p < 0,05$) e outro às 16 horas ($p < 0,05$). Após este período os níveis de glicose livre começam a diminuir, chegando ao final do período experimental a valores semelhantes aos iniciais ($p > 0,05$).

Comparando-se os valores de glicose livre hepatopancreática dos animais intactos e apedunculados, não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos.

Os valores de glicose livre no hepatopâncreas de animais intactos e apedunculados alimentados com dieta RC podem ser vistos na figura 14B. Constata-se no grupo intacto uma diminuição significativa dos valores de glicose livre a partir das 12 horas de estresse osmótico, às 72 e 144 horas, os níveis de glicose são 83% e 46%, respectivamente, menores que os iniciais. Nos caranguejos apedunculados os níveis de glicose livre diminuíram significativamente ($p < 0,05$) às 12 horas, mantendo-se estáveis entre 16 e 24 horas de estresse para no final do período experimental atingirem valores 60% e 46% menores que os iniciais.

Não foi constatada diferença significativa nos níveis iniciais de glicose livre entre os grupos RP e RC ($p > 0,05$).

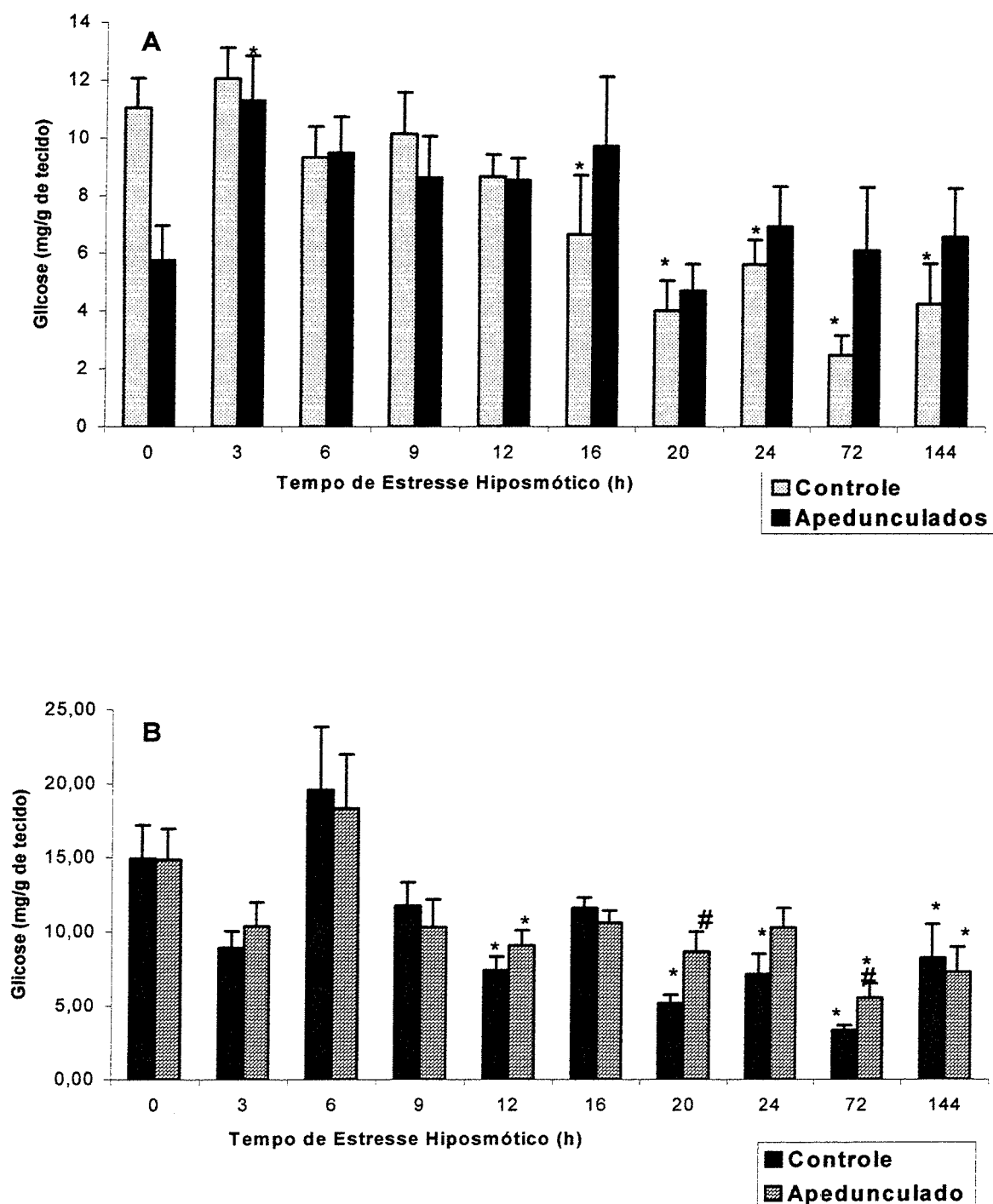


Figura 14: Níveis de glicose livre no hepatopâncreas ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

3.a. Concentração de glicogênio no músculo

As variações, ao longo do estresse hiposmótico, dos níveis de glicogênio no músculo de animais intactos e apedunculados alimentados com dieta RP, podem ser vistas na figura 15A. A concentração de glicogênio, nos animais intactos, diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a partir das 3h de estresse osmótico, restando apenas 9% do valor inicial às 144 horas. Nos animais apedunculados às 3 horas de estresse os valores de glicogênio muscular diminuíram significativamente ($p < 0,05$), contudo, às 6 horas sofreram um aumento de cerca de 31% e 61% em relação aos valores iniciais e às 3 horas experimentais, respectivamente. Após às 3 horas em água destilada, a concentração de glicogênio no músculo dos animais apedunculados não sofreu variação significativa em relação aos valores iniciais até às 72 horas. Entretanto, às 144 horas de estresse osmótico sofreram uma redução de 69% ($p < 0,05$) em relação aos valores iniciais. Somente foram encontradas diferenças significativas entre animais intactos e apedunculados às 3, 6 e 20h de estresse hiposmótico.

Os valores de glicogênio no músculo dos animais intactos alimentados com a dieta RC foram significativamente menores que os iniciais (zero hora) às 9, 72 144 horas de estresse osmótico. No grupo apedunculado, não foram verificadas diferenças significativas dos níveis de glicogênio até às 72 horas, atingindo, entretanto, às 144 horas valores 6 vezes menores ($p < 0,05$) que os iniciais e significativamente menores que os valores dos animais controles.

Comparando-se os níveis de glicogênio muscular dos animais intactos mantidos com as dietas RC ou RP, constatam-se valores de glicogênio cerca de 100% ($p < 0,05$) mais elevados nos caranguejos alimentados com a dieta RC.

RESULTADOS

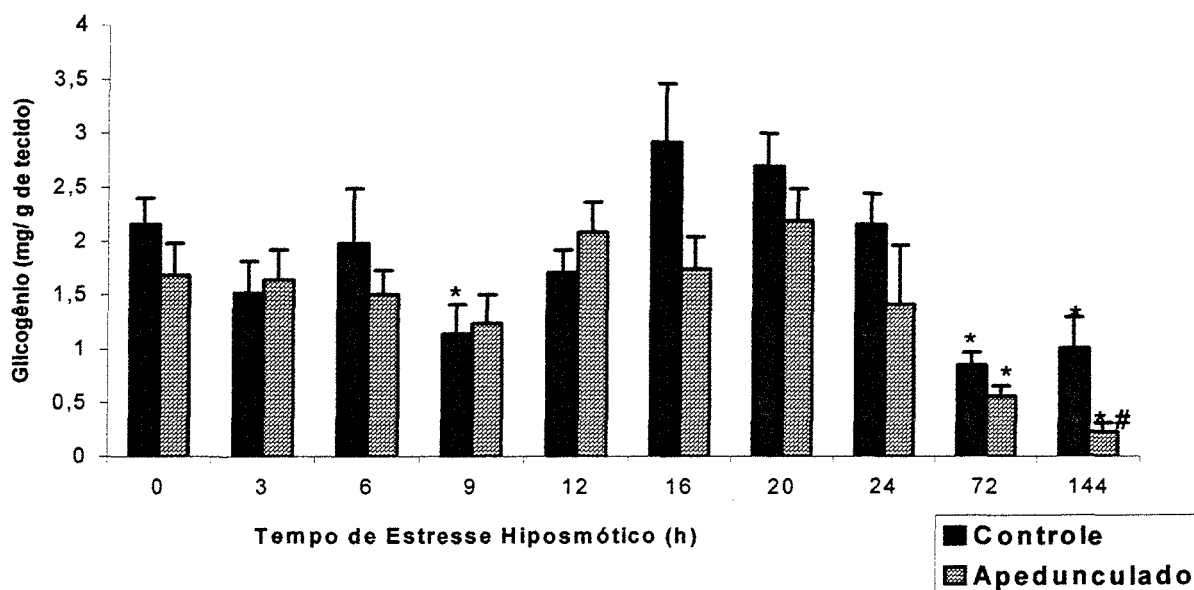
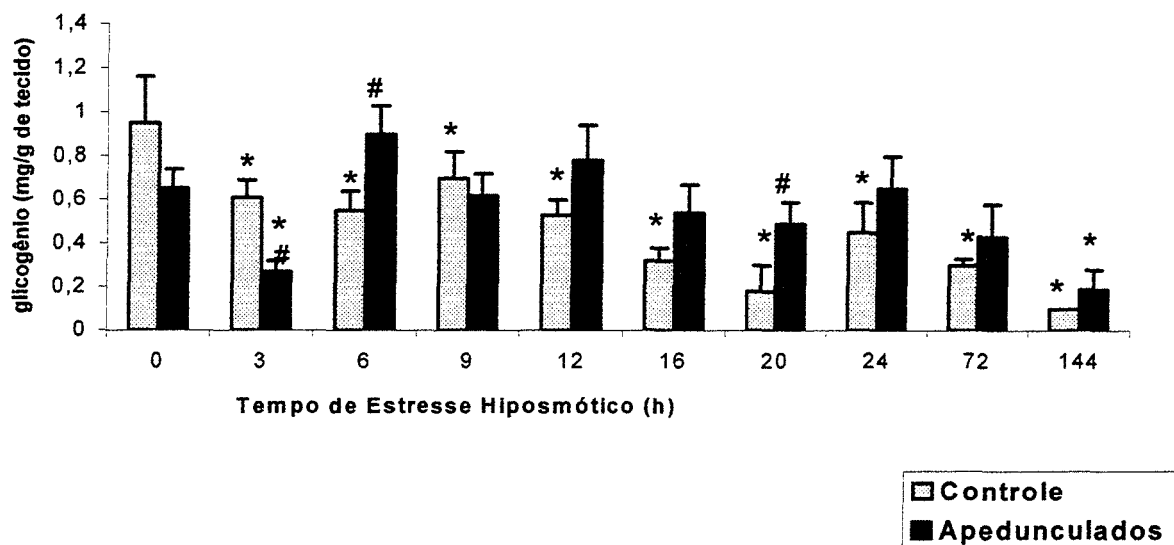


Figura 15: Níveis de glicogênio no músculo ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

3.b. Concentração de glicose livre no músculo

As variações, ao longo do estresse hiposmótico, dos níveis de glicose livre no músculo dos grupos intacto e apedunculado alimentados com as dietas RP e RC, podem ser vistas na figura 16 A.

Os valores de glicose livre no músculo de animais intactos ou apedunculados alimentados com dieta RP não sofreram variações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) ao longo do período de estresse osmótico estudado (Figura 16 A). Contudo, em ambos os grupos, os valores obtidos às 12 horas de estresse diferiram significativamente das 144 horas, indicando, talvez, uma tendência à redução da concentração de glicose livre no final do período experimental.

No tecido muscular dos animais intactos alimentados com a dieta RC (Figura 16 B), os valores de glicose livre diminuíram significativamente ($p < 0,05$) às 3 e 6 horas de estresse hiposmótico em relação aos valores iniciais. Às 20 horas de estresse osmótico os níveis de glicose aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em relação às 12 horas, contudo, no final do período experimental diminuíram a valores 35% menores ($p > 0,05$) que aos iniciais. Nos animais apedunculados os níveis de glicose livre no músculo não sofreram variações significativas até às 72 horas de estresse osmótico, entretanto, às 144 horas ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos valores de glicose. No grupo mantido com a dieta RC os níveis de glicose livre no músculo foram 44% maiores que aqueles dos caranguejos alimentados com a dieta RP.

Em ambas as dietas não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos intactos e apedunculados ($p > 0,05$).

RESULTADOS

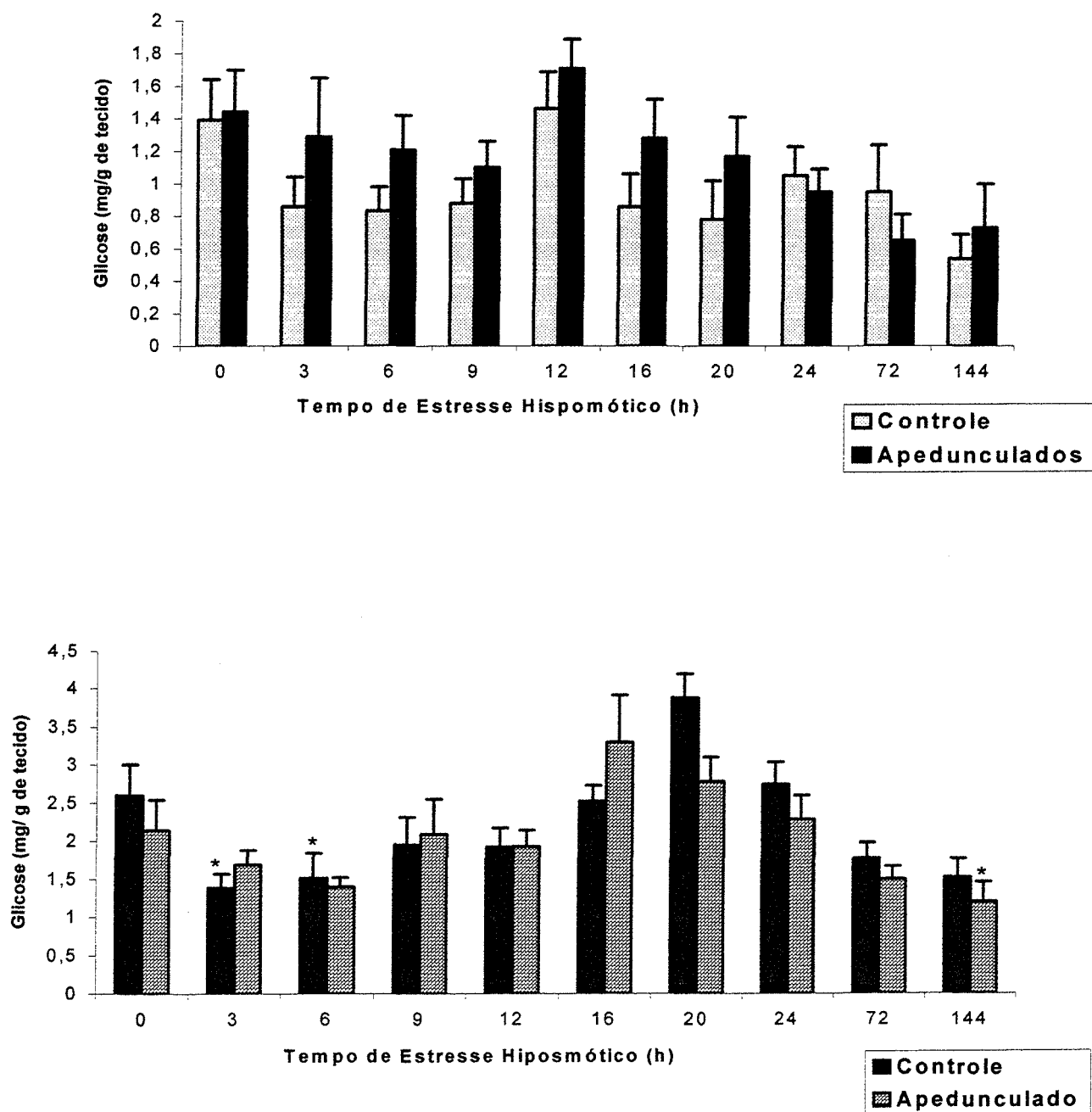


Figura 16: Níveis de glicose livre no músculo ao longo do estresse hipométrico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

4.a. Concentração de glicogênio nas brânquias anteriores

Os níveis de glicogênio nas brânquias anteriores de animais intactos alimentados com dieta RP (Figura 17A) aumentam significativamente em relação ao valor inicial após 3h de estresse, retornam a valores semelhantes aos iniciais às 6 horas. Entretanto, às 16 horas de estresse osmótico os níveis de glicogênio diminuem significativamente em relação aos valores iniciais, chegando ao final do período experimental (144 horas) a níveis 74% ($p < 0,05$) menores que os iniciais. Nos animais apedunculados, também, ocorreu uma elevação inicial (6 horas) nos níveis de glicogênio branquial. Contudo, no período compreendido entre 9 e 12 horas de estresse, os níveis de glicogênio nas brânquias dos animais apedunculados retornaram a valores próximos aos iniciais ($p > 0,05$). Às 16 horas de estresse, a concentração de glicogênio branquial diminuiu significativamente ($p < 0,05$), permanecendo constante até às 24 horas. A partir das 72 horas, novamente, sofre uma redução significativa em relação ao controle, até atingir um mínimo de 4,3 vezes, no final do período experimental.

Comparando os valores de glicogênio dos animais intactos e apedunculados do grupo RP nas brânquias anteriores, constatou-se níveis de glicogênio significativamente mais elevados às 3 horas nos animais controles e às 6 horas nos caranguejos apedunculados ($p < 0,05$).

Nos animais intactos alimentados com dieta RC (Figura 17 B), os níveis de glicogênio nas brânquias anteriores diminuem significativamente em relação aos valores iniciais somente às 72h de estresse ($p < 0,05$). Entretanto, às 144 horas constata-se um aumento de 55% da concentração de glicogênio em relação às 72 horas de estresse.

RESULTADOS

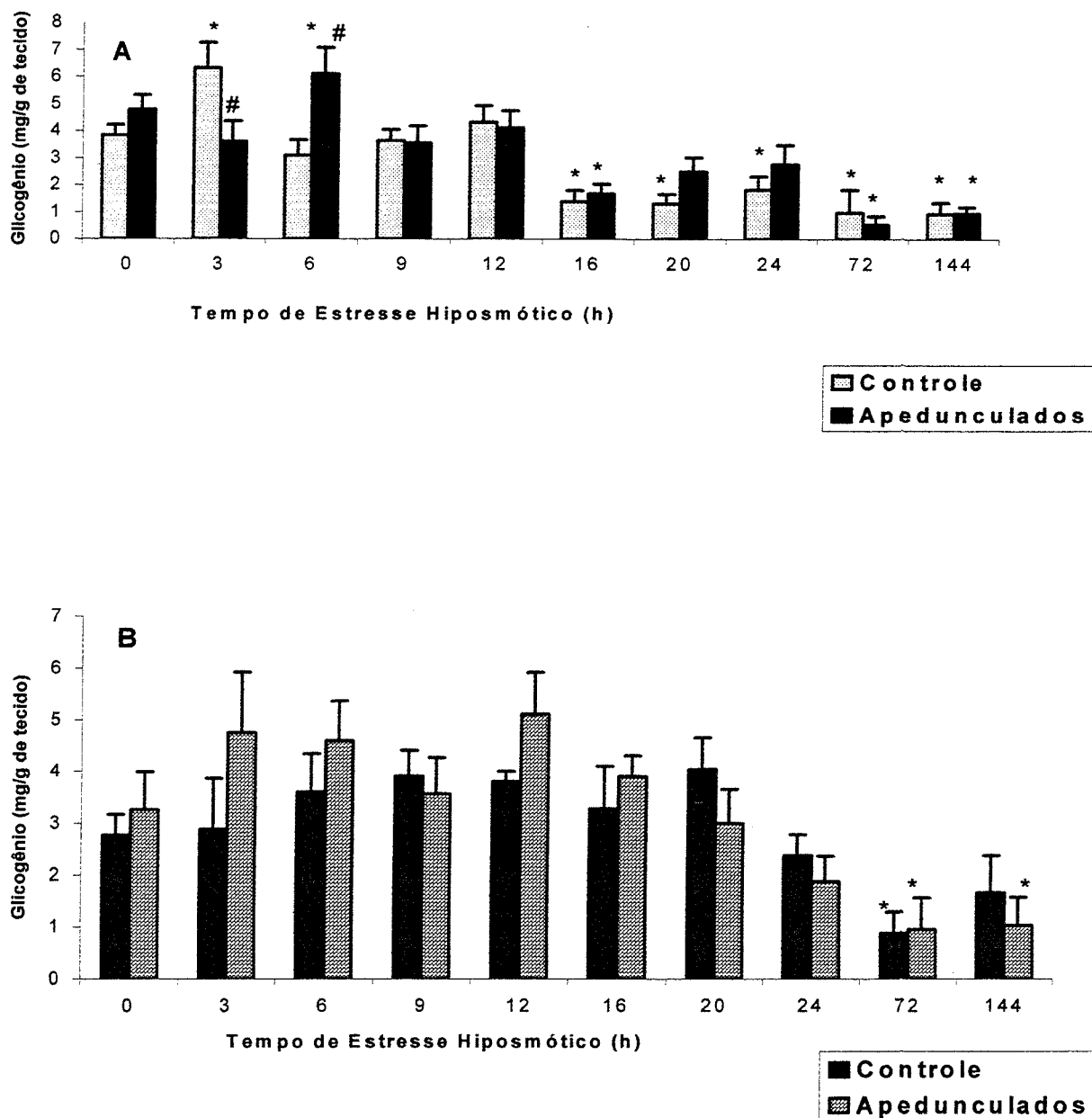


Figura 17: Níveis de glicogênio nas brânquias anteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

Nos animais apedunculados, os níveis de glicogênio branquial diminuíram significativamente em relação aos valores iniciais às 72 e 144h de estresse osmótico ($p < 0,05$).

Não foram constatadas diferenças significativas entre os animais intactos e apedunculados do grupo RC ao longo dos tempos de estresse estudados.

Comparando os valores de glicogênio branquial dos animais mantidos com as dietas RC e RP, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos controle e apedunculado antes do estresse ($p > 0,05$).

4.b. Concentração de glicose livre nas brânquias anteriores

Ao longo dos tempos de estresse hiposmótico estudado, os níveis de glicose livre nas brânquias anteriores de animais intactos alimentados com dieta RP (Figura 18 A) sofreram uma diminuição significativa em relação aos valores iniciais às 20 horas, embora, ao final do período experimental, chegassem a níveis 47% ($p > 0,05$) menores que os iniciais. Nos animais apedunculados, os valores de glicose livre obtidos dois dias após a ablação foram significativamente maiores que aqueles dos animais intactos ($p < 0,05$). Durante o estresse hiposmótico, os valores de glicose livre diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a partir das 3 horas e assim permaneceram até o final do período de estresse estudado.

Nos animais intactos alimentados com dieta RC, não foram constatadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos níveis de glicose livre das brânquias anteriores (Figura 18 B) entre aos diferentes tempos de estresse hiposmótico estudados. Nos animais apedunculados, foi constatada diferença significativa em relação aos valores iniciais somente às 144 horas

de estresse. Comparando-se animais intactos e apedunculados, somente foi encontrada diferença ($p < 0,05$) às 24h de estresse hiposmótico.

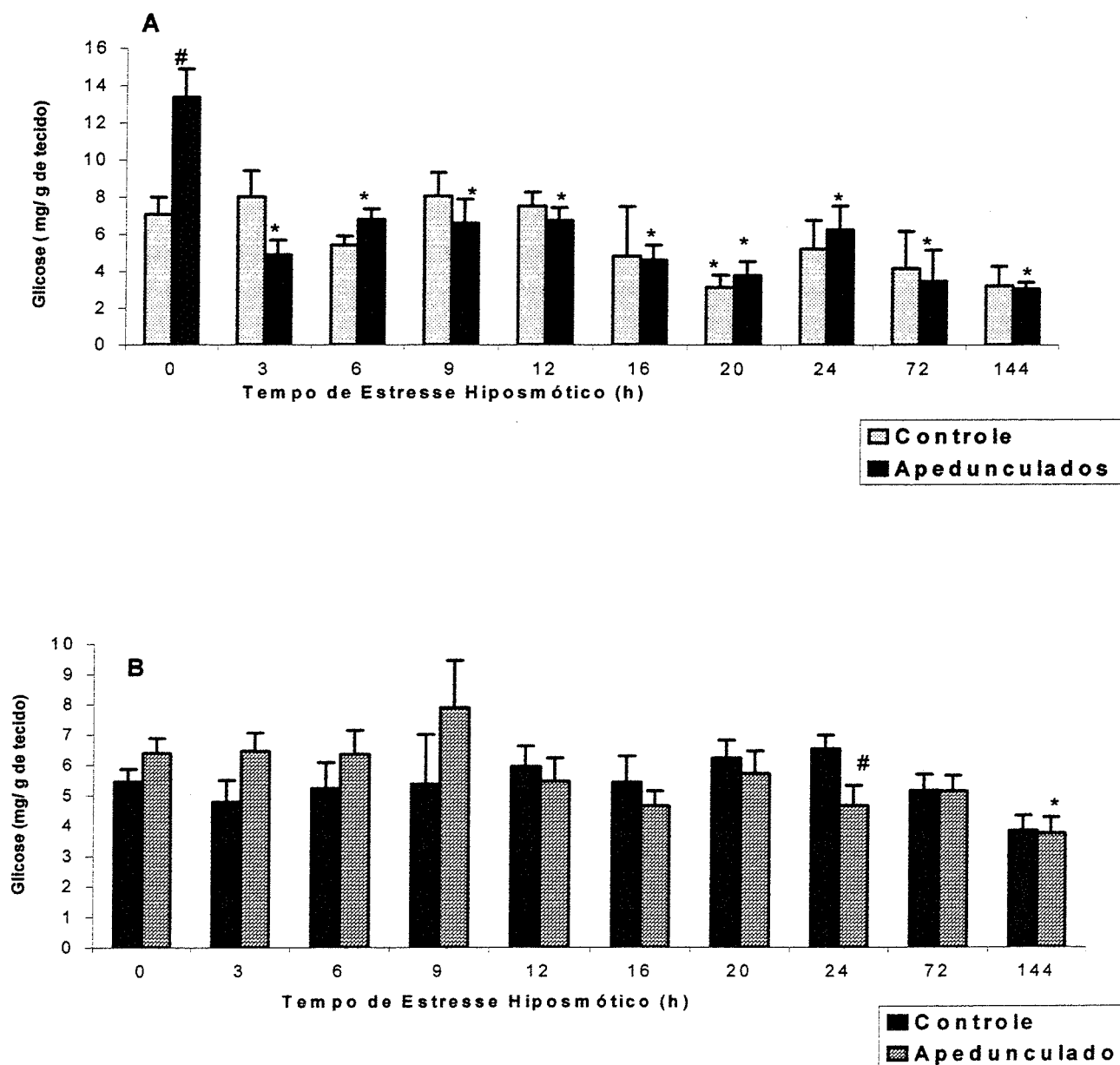


Figura 18: Níveis de glicose livre nas brânquias anteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

Comparando-se os efeitos das duas dietas sobre os níveis de glicose livre nas brânquias anteriores, não se verificam alterações significativas ao longo do período de tempo estudado ($p>0,05$).

5.a. Concentração de glicogênio nas brânquias posteriores

Nos animais intactos alimentados com dieta RP, os níveis de glicogênio nas brânquias posteriores elevaram-se significativamente ($p<0,05$) em relação ao valor inicial às 3 horas de estresse (Figura 19A). Às 6 horas retornaram a valores semelhantes aos iniciais, mantendo-se até às 12 horas de estresse, após diminuíram ($p<0,05$) progressivamente, restando apenas 19% ($p<0,05$) do valor inicial no final do período experimental. Nos animais apedunculados, os níveis de glicogênio mantiveram-se sem alterações significativas ($p>0,05$) durante 12 horas de estresse, a partir das 16 horas sofreram uma redução significativa ($p<0,05$) e no final do período experimental os valores correspondem a 69% da concentração inicial. Somente foram constatadas diferenças significantes entre os animais intactos e apedunculados às 3 horas de estresse osmótico ($p<0,05$).

Os níveis de glicogênio nas brânquias posteriores de animais intactos alimentados com dieta RC (Figura 19B) sofreram um aumento significativo ($p<0,05$) em relação aos valores iniciais às 9, 12 e 20 horas de estresse. Entretanto, a partir das 24 horas de estresse a concentração de glicogênio diminui, restando apenas 50% ($p>0,05$) do valor inicial às 144 horas de experimento. Nos animais apedunculados foi verificada uma elevação ($p<0,05$) nos níveis de glicogênio branquial às 12 horas de estresse, seguida de uma redução a partir das 16 horas de experimento, restando ao final do período de estresse 36% ($p<0,05$) do valor inicial.

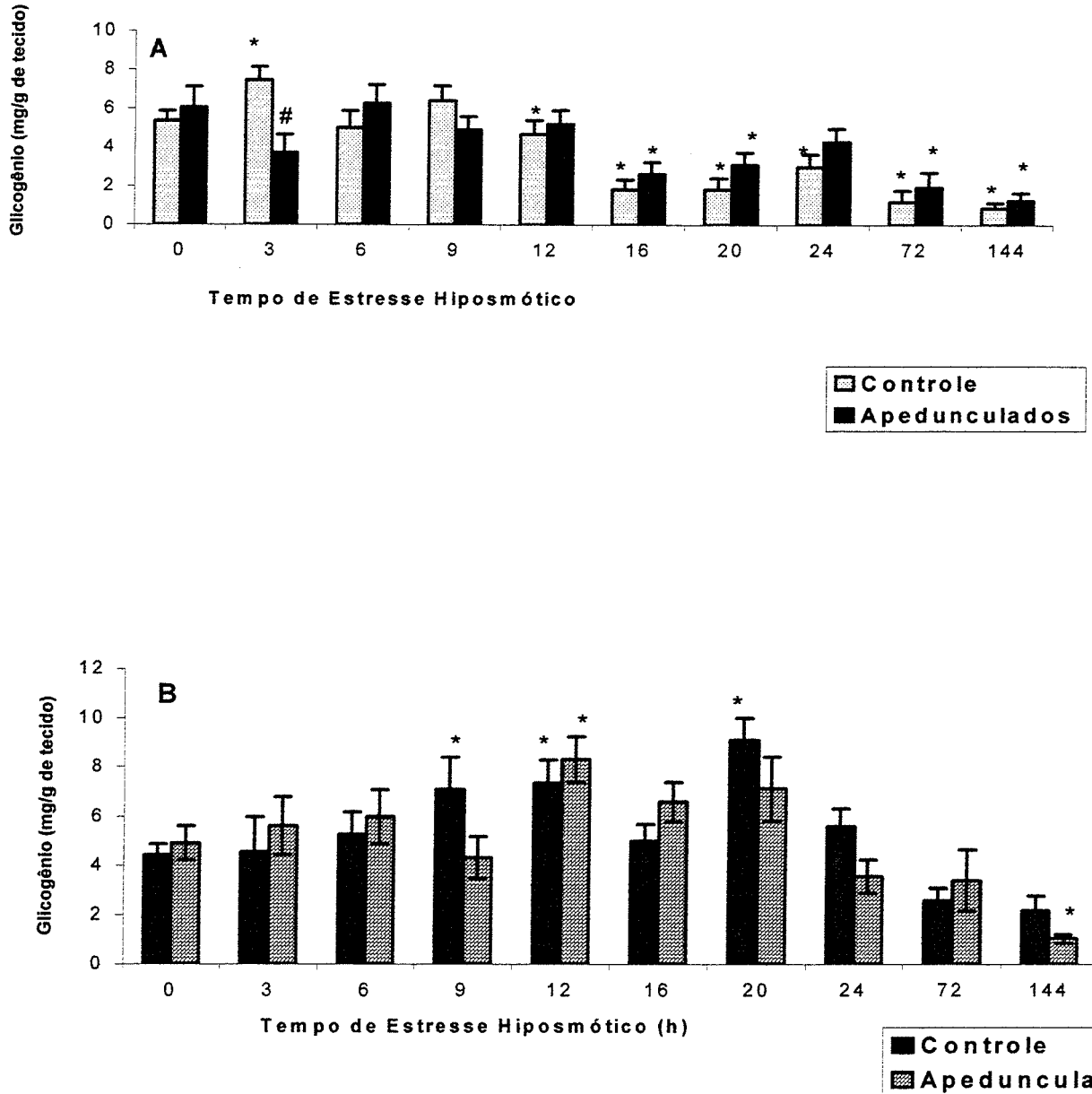


Figura 19: Níveis de glicogênio nas brânquias posteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

Não foram constatadas diferenças significativas entre os animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RC nos níveis de glicogênio nas brânquias posteriores ao longo do período de tempo experimental estudado ($p > 0,05$). Comparando-se animais intactos alimentados com as dietas RC e RP, também não foram encontradas diferenças significativas ao longo do período experimental ($p > 0,05$).

5.b. Concentração de glicose livre nas brânquias posteriores

Os níveis de glicose livre nas brânquias posteriores tanto dos animais intactos como daqueles apedunculados alimentados com dieta RP (Figura 20A), não sofreram alterações significativas durante às 12 horas de estresse ($p < 0,05$). Contudo, a partir das 16 horas em água destilada, ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) de 57% e 62% nos grupos controle e apedunculados, respectivamente, assim permanecendo até o final do período experimental estudado. Somente foi verificada diferença significativa entre os caranguejos intactos e apedunculados às 20 horas de estresse.

Nos animais intactos alimentados com a dieta RC (Figura 20B) foram verificadas reduções significativas da concentração de glicose livre, em relação ao nível inicial, às 3 e 144 horas de estresse osmótico ($p < 0,05$). Nos animais apedunculados, os níveis de glicose livre às 72 e 144 horas de estresse foram estatisticamente menores que aqueles do tempo zero. Comparando-se os grupos intacto e apedunculado, não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes dos valores de glicose livre branquial.

Quando comparadas as duas dietas, os valores obtidos nos animais RP foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que aqueles do grupo RC às 3, 9 e 12 horas de estresse osmótico. Contudo, às 16 a 24 horas de estresse os valores de glicose livre verificados nos

animais RC foram significativamente maiores que aqueles do grupo RP. No final do período experimental, entretanto, os valores são semelhantes ($p>0,05$).

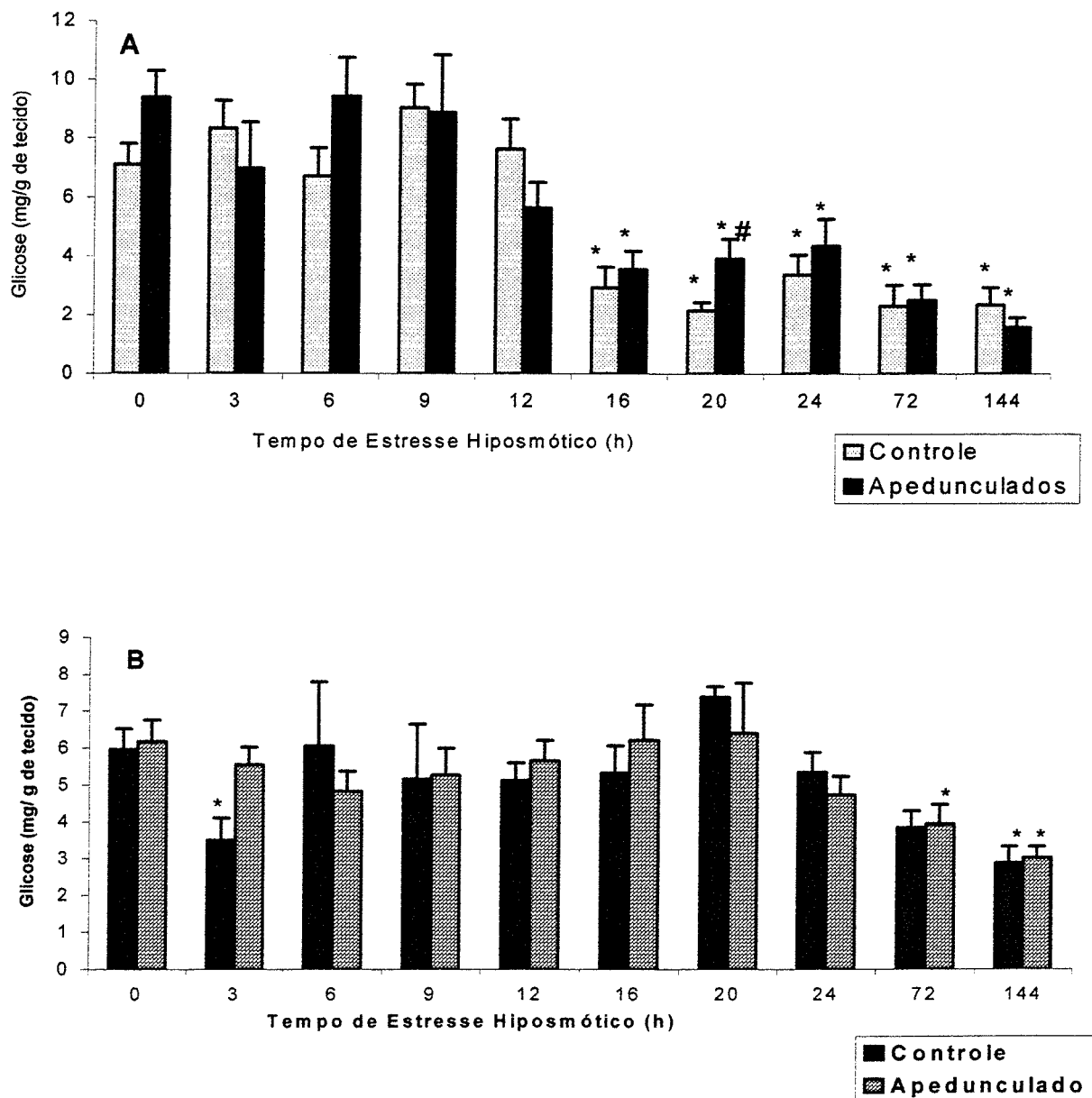


Figura 20: Níveis de glicose livre nas brânquias posteriores ao longo do estresse hiposmótico em animais intactos e apedunculados alimentados com as dietas RP (A) ou RC (B). Os valores representam as médias e as barras verticais representam os erros padrões. * diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao tempo zero. # diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) em relação ao grupo controle no mesmo tempo de estresse. Foram utilizados de 4-26 animais por tempo de estresse.

III EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO DOS PEDÚNCULOS OCULARES SOBRE A GLICOSE HEMOLINFÁTICA DE CARANGUEJOS MANTIDOS COM AS DIETAS RC OU RP

Nos animais intactos e apedunculados alimentados com a dieta RC (Figura 21), a injeção de salina normal não causou variação estatisticamente significativa no período experimental estudado ($p>0,05$). Tanto nos animais intactos como naqueles apedunculados, a administração do meio de incubação com 4 pedúnculos (M4P) aumentou significativamente ($p<0,05$) a concentração de glicose hemolinfática a partir de 60 minutos após a injeção. No final do período experimental os níveis de glicose na hemolinfa dos animais intactos atingiram valores 3,8 vezes mais elevados ($p<0,05$) que os valores iniciais. Já no grupo apedunculado, esses valores foram 12 vezes maiores ($p<0,05$).

Em animais intactos alimentados com dieta RP (Figura 22), a injeção do meio resultante da incubação de 4 pedúnculos em salina normal (M4P) não causou elevação significativa ($p>0,05$) nos valores de glicose hemolinfática. Entretanto, a injeção do meio resultante da incubação de 8 pedúnculos em salina normal (M8P) aumentou significativamente ($p<0,05$) os níveis de glicose hemolinfática aos 60 minutos, permanecendo elevados até o final do período experimental. A administração do meio resultante da incubação de 12 pedúnculos em salina normal (M12P), causou elevação significativa ($p<0,05$) dos valores de glicose na hemolinfa nos períodos de tempo estudados, contudo, não foi constada diferença significativa entre os grupos tratados com 8 ou 12 pedúnculos.

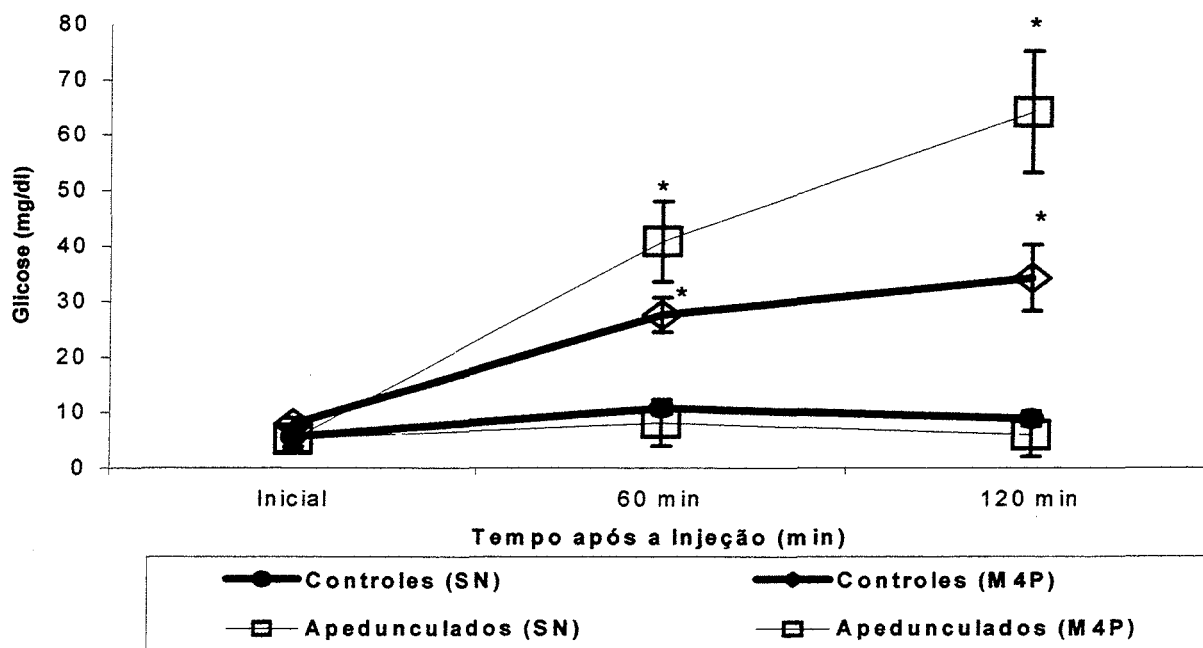


Figura 21: Concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos e apedunculados alimentados com dieta RC antes e após a injeção de salina normal (SN) e meio resultante da incubação de 4 pedúnculos frescos em salina (M4P). Os valores correspondem a média \pm EPM de 4 experimentos. O Número amostral variou entre 7 a 23 para os animais intactos e entre 5 a 9 para os apedunculados. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

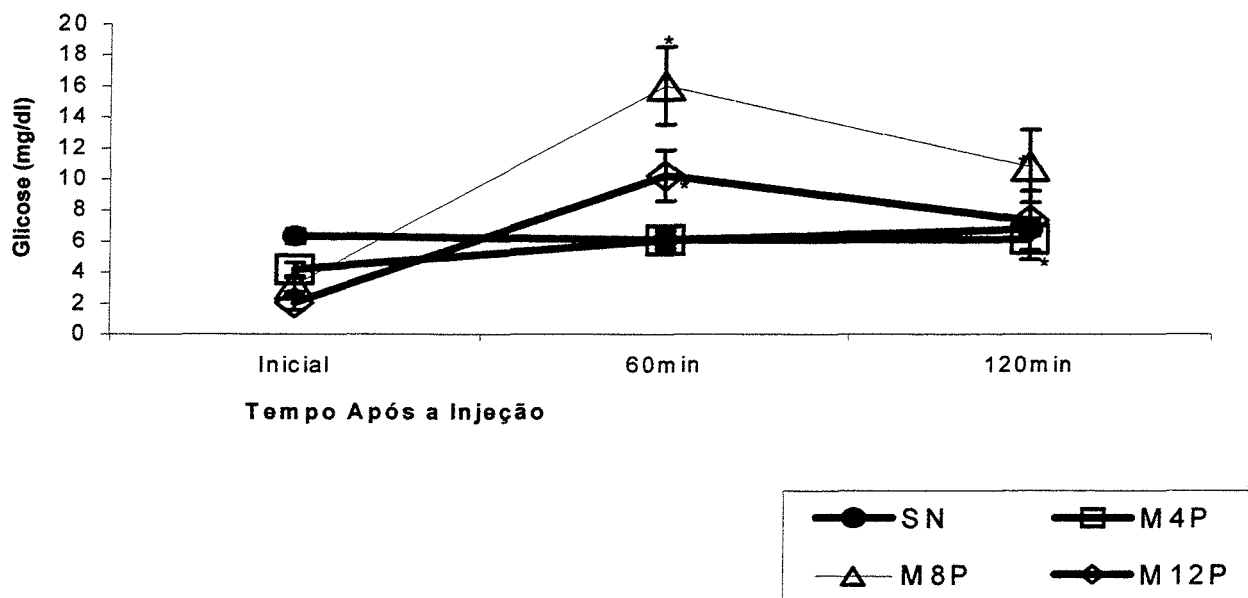


Figura 22: Concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com dieta RP antes e após a injeção de solução salina (SN) e meio resultante da incubação de 4 (M4P), 8 (M8P) ou 12 (M12P) pedúnculos frescos em salina. Os valores correspondem a média \pm EPM de 3 experimentos. Número amostral variou entre 34 a 21 para o grupo salina e entre 6 a 23 para os demais grupos. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

Também, nos animais apedunculados alimentados com dieta RP (Figura 23), a administração de solução salina e de meio de incubação contendo 4 pedúnculos não causou elevação significativa ($p > 0,05$) da concentração de glicose hemolinfática. Contudo, a injeção do meio de incubação com 8 pedúnculos aumentou significativamente ($p < 0,05$) a

glicose hemolinfática após 60 minutos permanecendo elevada até os 120 minutos. O meio contendo 12 pedúnculos somente causou elevação significativa ($p < 0,05$) dos níveis de glicose em relação aos valores iniciais 120 minutos após sua aplicação. Ao compararmos os efeitos dos meios contendo 8 e 12 pedúnculos, o efeito do segundo meio foi menor ($p < 0,05$).

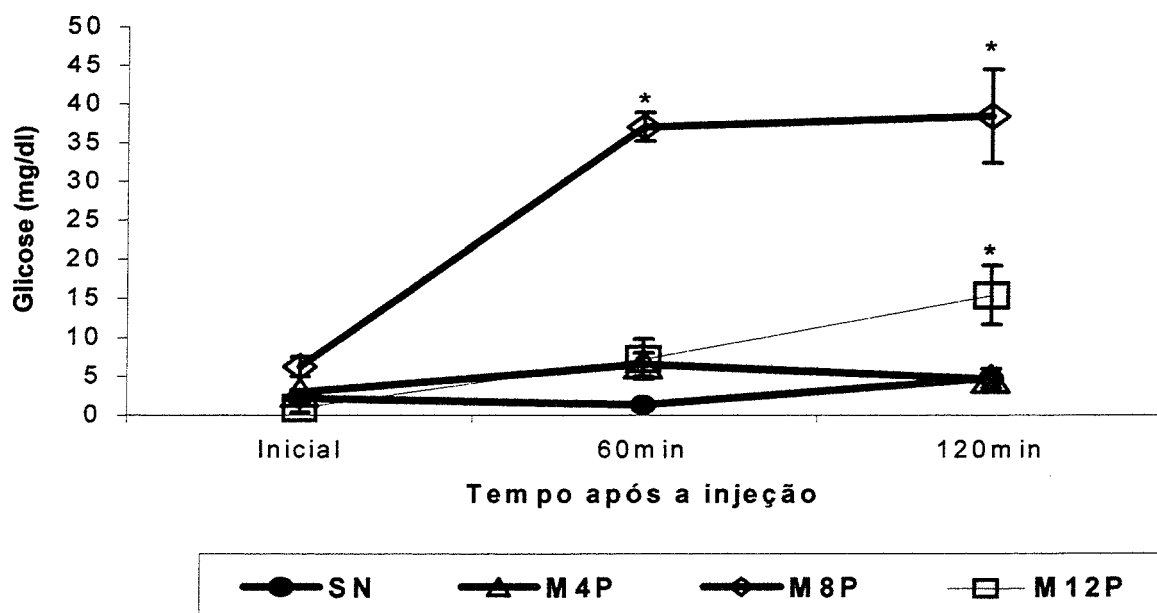


Figura 23: Concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com dieta RP antes e após a injeção de solução salina (SN) e meio resultante da incubação de 4 (M4P), 8 (M8P) ou 12 (M12P) pedúnculos em salina. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos. Número amostral variou entre 3 a 16 animais. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

IV EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MONOAMINAS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE HEMOLINFÁTICA E A POSTURA DE ANIMAIS INTACTOS OU APEDUNCULADOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS RC OU RP

A. Efeitos da administração de serotonina

Os valores de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RC após a administração de diferentes doses de serotonina estão representados na figura 24. A administração de solução salina não causou nenhuma variação significativa ($p > 0,05$) nos valores de glicose hemolinfáticos. As doses de $2,6 \times 10^{-8}$ e de $2,6 \times 10^{-7}$ moles/caranguejo somente aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de glicose hemolinfática aos 30 minutos após a administração. Já a dose de $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo, apresentou efeito hiperglicêmico ($p < 0,05$) a partir de 60 minutos após sua administração e os níveis permaneceram elevados até o final do período experimental.

Nos animais apedunculados alimentados com a dieta RC (figura 25), a administração de solução salina também não causou alterações significativas ($p > 0,05$) nos valores de glicose hemolinfáticos. Nos animais apedunculados a dose de serotonina administrada foi de $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo e apresentou efeito hiperglicêmico ($p < 0,05$) a partir de 60 minutos, atingindo aos 120 minutos valores significativamente maiores que aqueles do grupo intacto no mesmo período de tempo. A mesma dose de serotonina também foi aplicada em animais cujos pedúnculos haviam sido removidos 6 e 8 dias antes e, nesses grupos, os valores de glicose hemolinfáticos aumentaram ($p < 0,05$) cerca de 6 e 7 vezes em relação aos valores iniciais, respectivamente.

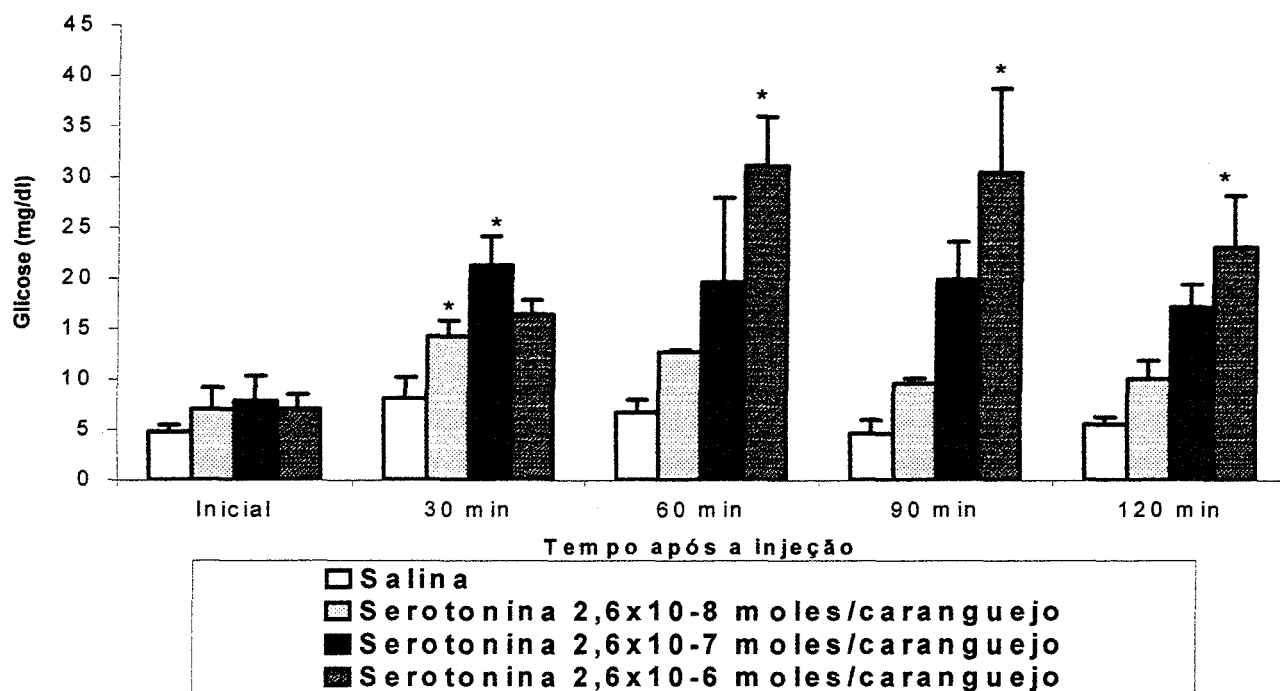


Figura 24: Efeito de diferentes doses de serotonina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RC. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 3 a 6 por grupo. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

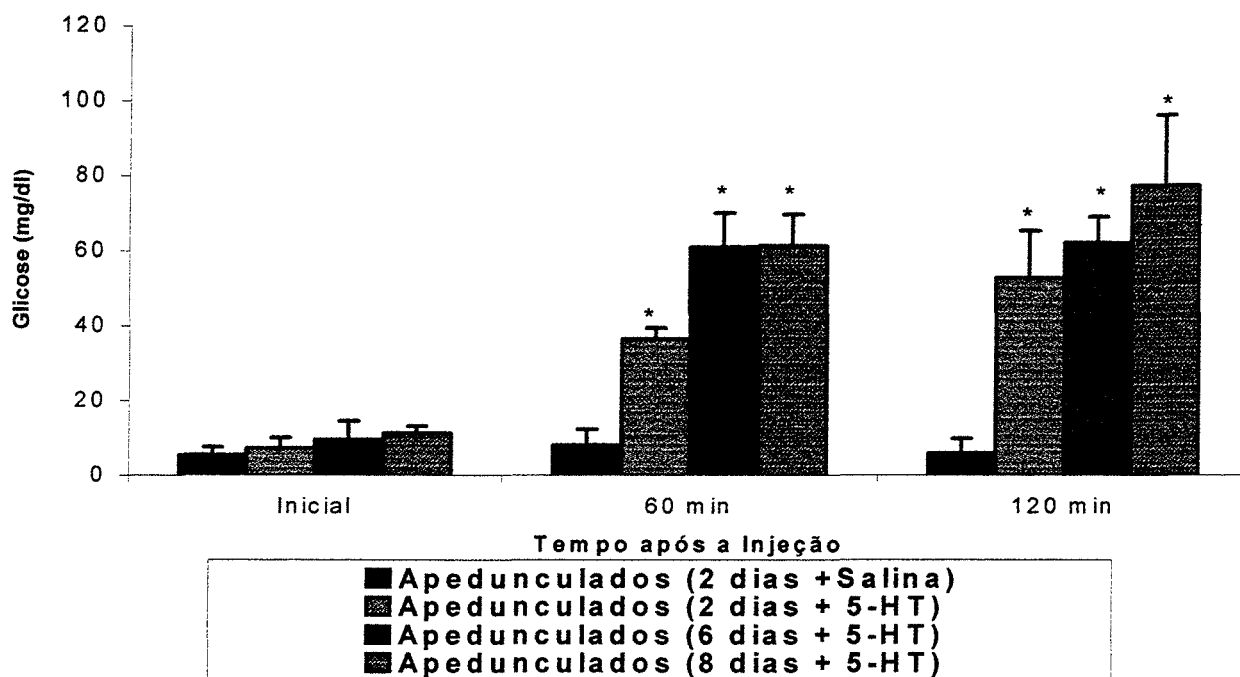


Figura 25: Efeito da administração de solução salina e de serotonina ($2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo) sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com a dieta RC. Foram utilizados animais cujos pedúnculos haviam sido removidos 2 dias (2D), 6 dias (6D) e 8 dias (8D) antes. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 3 a 6 por grupo. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

Nos animais do grupo RP, a administração de solução salina também não causou elevação ($p > 0,05$) nos valores de glicose hemolinfáticos tanto em animais intactos (figura 26) como apedunculados (figura 27). As diferentes doses de serotonina administradas aos caranguejos alimentados com a dieta RP, aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de glicose hemolinfática a partir de 30 minutos assim permanecendo até os 120 minutos.

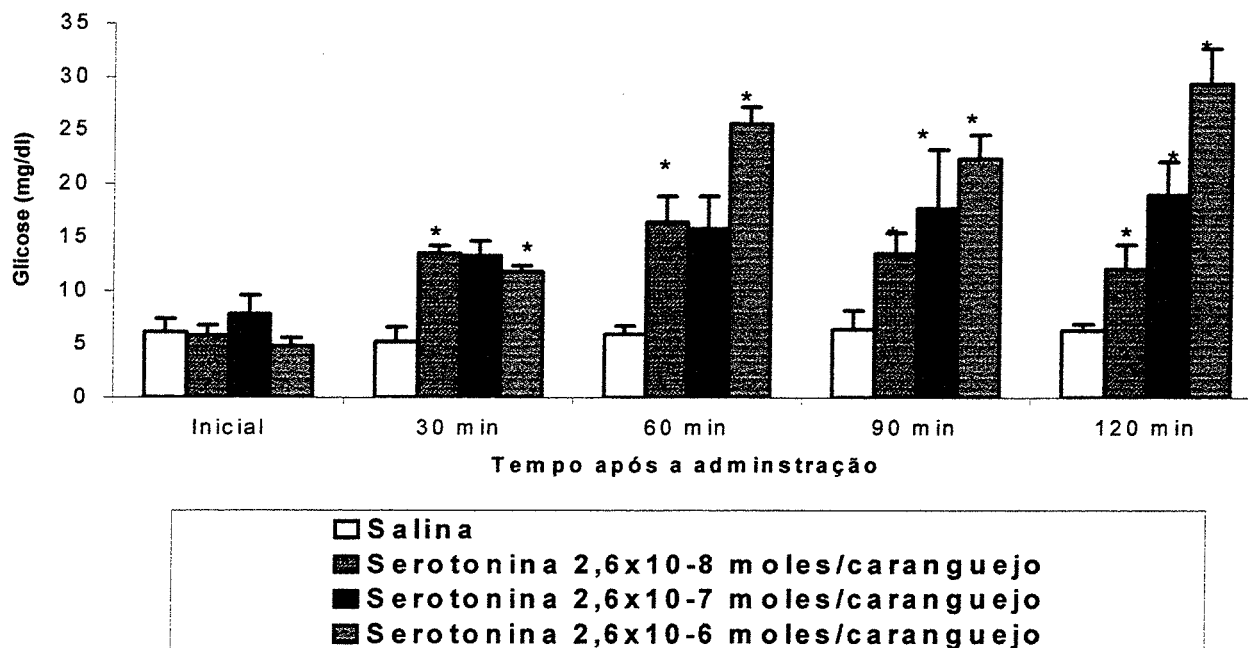


Figura 26: Efeito de diferentes doses de serotonina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RP. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 3 a 6 por grupo. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

Nos animais cujos pedúnculos haviam sido removidos dois dias antes do experimento, a dose de serotonina de $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo elevou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de glicose na hemolinfa somente aos 60 minutos, porém em animais cujos pedúnculos haviam sido removidos 7 ou 9 dias antes, os valores de glicose hemolinfáticos aumentaram ($p < 0,05$) cerca de 6 e 10 vezes respectivamente em relação aos níveis iniciais 60 minutos após a aplicação de serotonina e permaneceram elevados até 120 minutos.

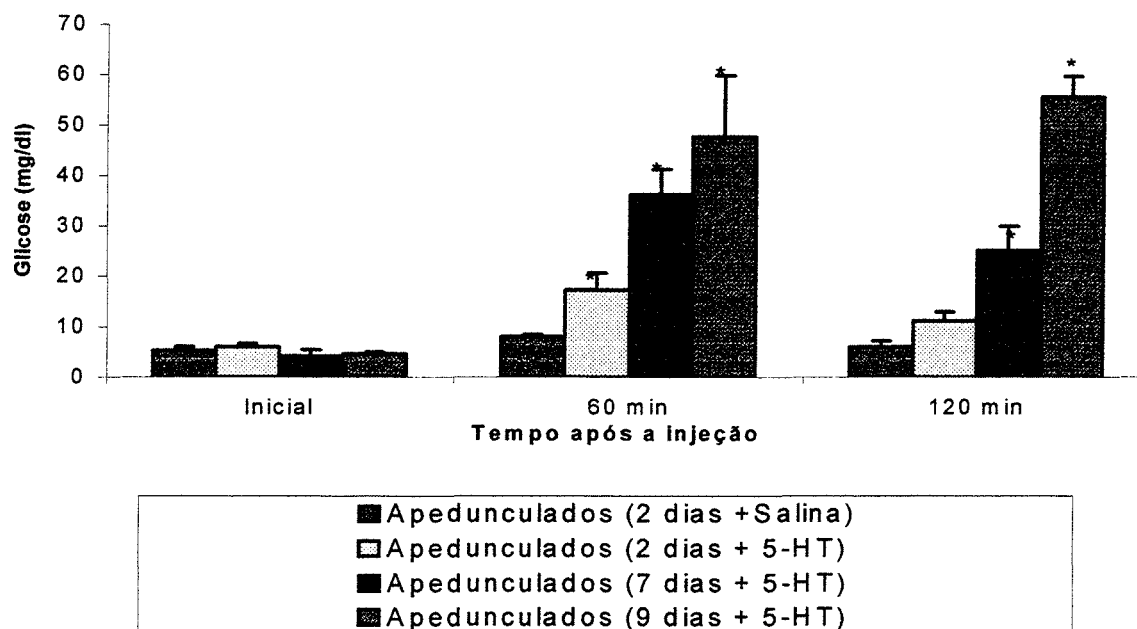


Figura 27: Efeito da administração de solução salina e de serotonina ($2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo) sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com a dieta RP. Foram utilizados animais cujos pedúnculos haviam sido removidos 2 dias (2D), 7 dias (7D) e 9 dias (9D) antes. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 3 a 6 por grupo. *: diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

Também, a administração de serotonina em todas as doses utilizadas nos experimentos, tanto em animais intactos como apedunculados alimentados com as dietas RC ou RP causou uma alteração postural caracterizada por grande rigidez muscular em flexão, como no exemplo da figura 28.

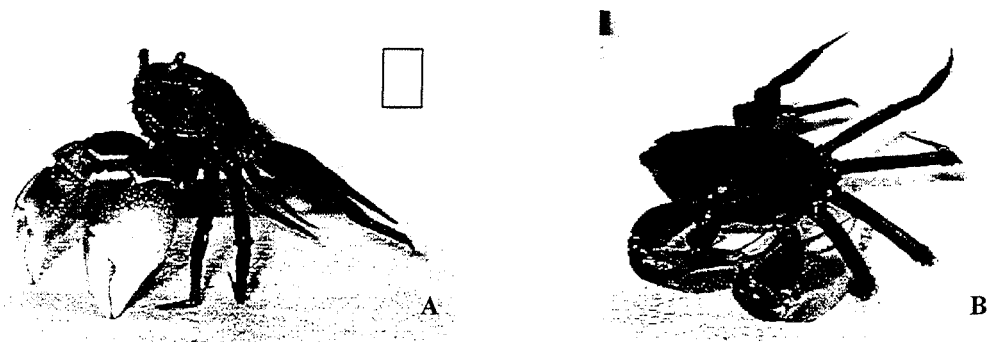


Figura 28: Efeito da injeção de serotonina ($2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo) sobre a postura do caranguejo *Chasmagnathus granulata*., 5 (A) e 120 minutos (B) após a aplicação.

B. Efeitos da administração de dopamina

Os efeitos da administração de diferentes doses de dopamina em animais intactos alimentados com a dieta RC, podem ser vistos na figura 29. Nesses caranguejos, a administração de solução salina e a dose de dopamina de $5,3 \times 10^{-8}$ moles/caranguejo não alteraram significativamente ($p < 0,05$) os valores de glicose hemolinfáticos ao longo do período estudado. Contudo, a dose de dopamina de $5,3 \times 10^{-7}$ moles/caranguejo aumentou significativamente os níveis circulantes de glicose aos 30, 90 e 120 minutos após sua administração. A dose de dopamina de $5,3 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo causou efeito hiperglicêmico ($p < 0,05$) a partir de 30 minutos e os níveis permaneceram elevados até o final do período experimental.

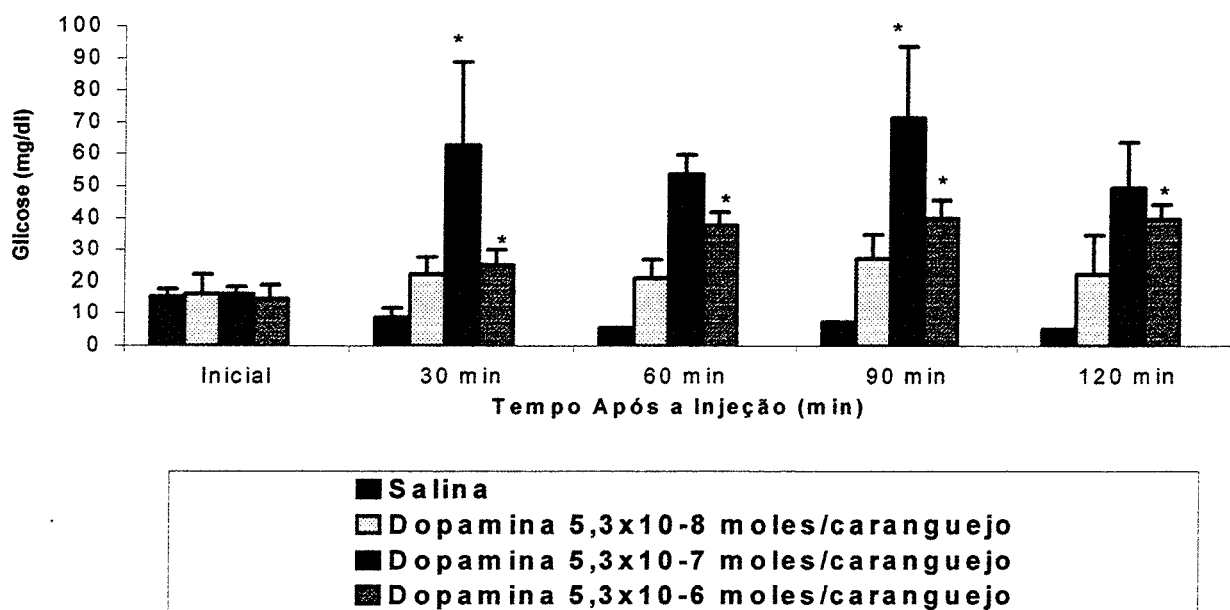


Figura 29: Efeito de diferentes doses de dopamina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RC. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 3 a 11 por grupo. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

A injeção de dopamina, em animais intactos previamente alimentados com dieta RP (figura 30), na dose de $5,3 \times 10^{-8}$ moles/caranguejo não alterou significativamente ($p > 0,05$) os valores de glicose na hemolinfa nos tempos experimentais estudados. A dose de dopamina de $5,3 \times 10^{-7}$ moles/caranguejo aumentou ($p < 0,05$) a concentração de glicose na hemolinfa aos 30 e 90 minutos de experimento. Já, a dose de dopamina de $5,3 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo teve um efeito hiperglicêmico ($p < 0,05$) a partir de 30 minutos após administração da bioamina e os níveis permaneceram elevados até o final do período experimental.

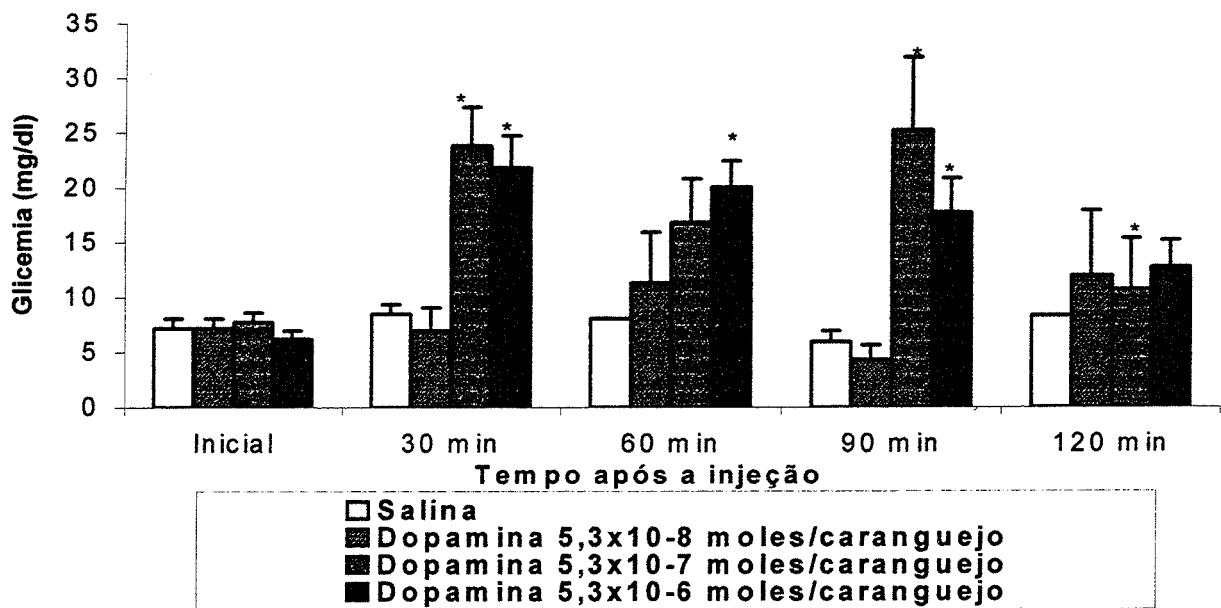


Figura 30: Efeito de diferentes doses de dopamina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais intactos alimentados com a dieta RP. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 3 a 10 por grupo. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

Nos animais apedunculados alimentados com a dieta RC (figura 31), a dose dopamina injetada foi de $5,3 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo e causou elevação significativa ($p < 0,05$) nos valores de glicose hemolinfática aos 60 e 120 minutos de experimento. Já nos animais apedunculados alimentados com a dieta RP, esta mesma dose de dopamina não causou alterações estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos valores de glicose hemolinfáticos.

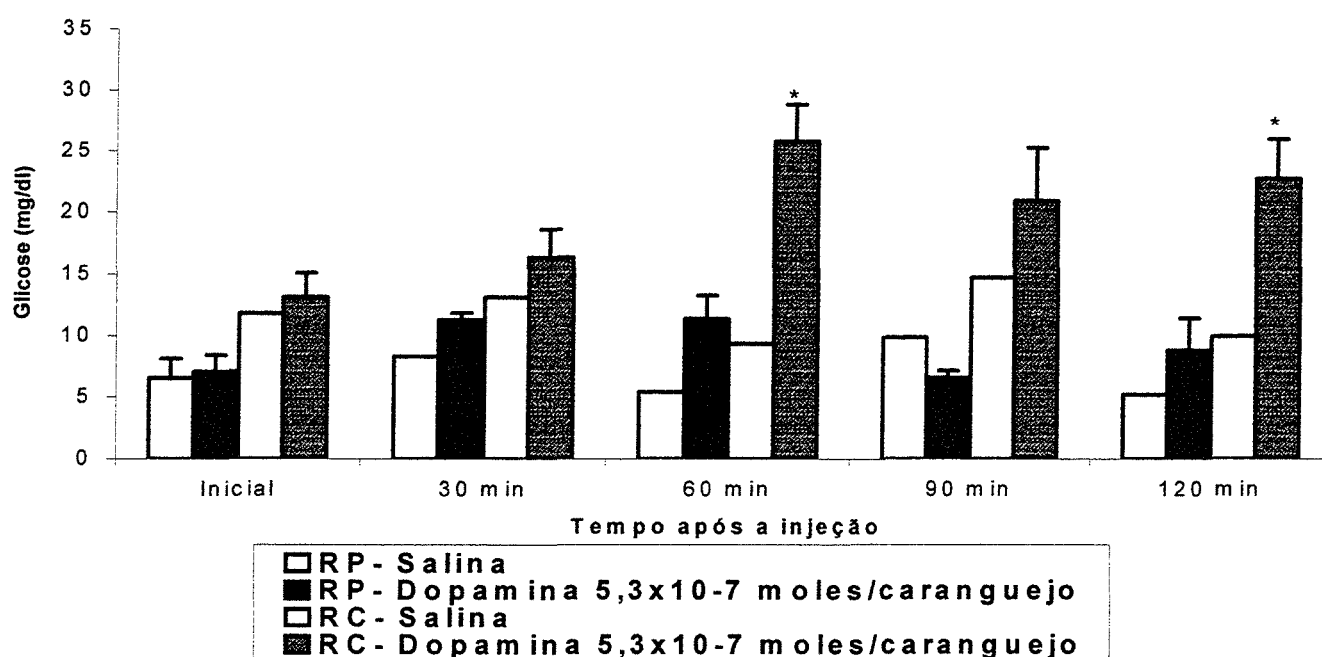


Figura 31: Efeito da dopamina ($5,3 \times 10^{-7}$ moles/caranguejo) sobre a concentração de glicose na hemolinfa de animais apedunculados alimentados com as dietas RP e RC. Os valores correspondem a média \pm EPM de 2 experimentos, o número amostral variou entre 2 a 9 por grupo. * diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero.

A administração de dopamina nas diferentes doses estudadas causou uma marcante alteração postural em todos os grupos de animais, caracterizada por rigidez em extensão (Figuras 32 e 33A).

RESULTADOS

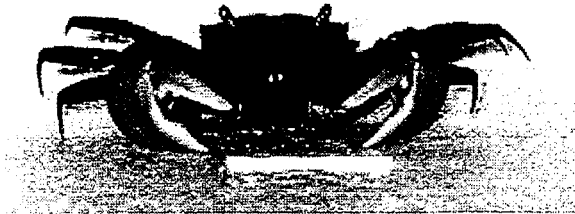


Figura 32: Postura do caranguejo *Chasmagnathus granulata* 30 minutos após a injeção de dopamina ($5,3 \times 10^{-7}$ moles/ caranguejo).

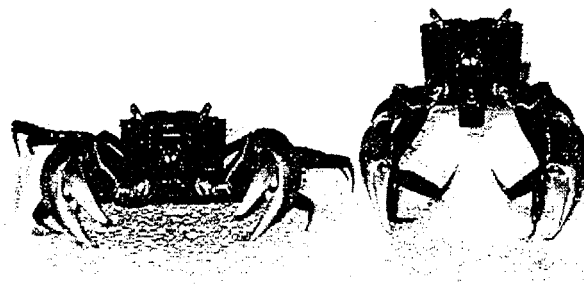


Figura 33: Postura do caranguejo *Chasmagnathus granulata* 60 minutos após a injeção de $5,3 \times 10^{-7}$ moles/ caranguejo de dopamina (A) e $2,6 \times 10^{-6}$ moles/caranguejo serotonina (B).

DISCUSSÃO

I. EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE A SÍNTESE DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E LIPÍDEOS TOTAIS

Antes de discutir os resultados obtidos, convém salientar que a incorporação de ^{14}C da glicose nos produtos finais representou uma boa estimativa da taxa de síntese, visto que não ocorreram alterações significativas na atividade específica da glicose circulante nos três grupos estudados ao longo do período experimental. Os níveis de glicose hemolinfática não foram alterados significativamente nem pelo jejum nem pela realimentação e a concentração de glicose administrada ($1\mu\text{Ci}$) sempre foi a mesma. Por outro lado, os níveis de glicina circulantes não foram determinados nos diferentes grupos experimentais, embora, a concentração de glicina marcada injetada ter sido a mesma ($1\mu\text{Ci}$), é possível que tenham ocorrido alterações da atividade específica deste aminoácido. Dessa maneira, os resultados de incorporação de glicina- ^{14}C em produtos finais devem ser interpretados com cautela nos casos em que as diferenças obtidas forem relativamente pequenas. Quatro horas após a administração de glicina- ^{14}C ou glicose- ^{14}C , os valores de radioatividade na hemolinfa dos animais dos três grupos experimentais foram similares, indicando uma utilização semelhante dos precursores nos caranguejos alimentados, em jejum e realimentados.

No presente trabalho, no estudo sobre os processos endergônicos de síntese, em caranguejos alimentados, em jejum e realimentados foram utilizados animais adaptados à dieta RP, pois na maioria dos experimentos realizados com crustáceos ou nas criações comerciais é essa a composição do alimento utilizada. Foram escolhidas três semanas de restrição alimentar, pois caracterizam o momento de transição entre o jejum moderado

(fasting) e o prolongado (starvation). Neste momento, os níveis de glicose circulantes dos animais alimentados e em jejum são semelhantes, entretanto, a concentração de glicogênio no hepatopâncreas é significativamente menor em relação àquela dos animais alimentados (Oliveira, 1993).

Os experimentos *in vitro* tiveram como objetivo verificar se a capacidade intrínseca de síntese dos tecidos estaria reduzida ou ativada no jejum ou na realimentação, respectivamente.

A realimentação após períodos prolongados de restrição alimentar é considerada uma fase metabólica transitória e apresenta características distintas do jejum e do estado alimentado. A chegada de nutrientes após um período prolongado de jejum, provoca em vertebrados uma certa “histeria metabólica”, que dependendo da espécie estudada leva um tempo relativamente longo para restaurar o padrão metabólico do estado alimentado. Em ratos, esta fase é caracterizada por uma “super” estimulação dos processos endergônicos de síntese, principalmente, glicogênese. Nestes animais, durante jejum mais prolongado, a glicemia é mantida, em parte, pelo consumo de ácidos graxos, que servem de substratos para a síntese de glicose. Quando o animal é realimentado, a gliconeogênese mantém-se ativada de forma que a glicose excedente é convertida em glicogênio (Sugden e cols., 1989; Shulman e Landau, 1992). Este fenômeno ficou conhecido como “paradoxo da glicose” e vários autores mostraram que nesses animais, a síntese de glicogênio durante o processo de realimentação ocorre pela via indireta, envolvendo a gliconeogênese (glicose \Rightarrow glicose-6-P \Rightarrow compostos com 3 carbonos \Rightarrow glicose-6-P \Rightarrow glicogênio) ao invés da via direta (glicose \Rightarrow glicose-6-P \Rightarrow glicogênio) (Newgart e cols., 1984; Schulman e Landau, 1992).

Contrariamente ao que ocorre em vertebrados (Machado e cols., 1988; Da Silva e Migliorini, 1990), em *C. granulata* o jejum de três semanas não diminuiu os processos de síntese de glicogênio e de lipídios a partir de glicose- ^{14}C nos três tecidos estudados. Este padrão diferencial de resposta ao jejum, poderia ser explicado pelas peculiaridades da biologia e ecologia desse caranguejo, que em seu habitat natural muitas vezes é submetido à períodos longos de restrição alimentar, por escassez de alimento ou variações extremas de fatores ambientais. Desta forma, ciclos longos de jejum fazem parte da vida desses animais, que manteriam os processos endergônicos de síntese ativados durante esses períodos.

Os resultados *in vitro* sobre a incorporação da glicose-U- ^{14}C em glicogênio nos três tecidos estudados de animais alimentados e em jejum, confirmam os dados obtidos *in vivo*. O jejum não diminuiu a capacidade intrínseca dos tecidos hepatopancreático, branquial e muscular de sintetizar glicogênio a partir de glicose-U- ^{14}C . Um aspecto deve ser ressaltado, que tanto *in vivo* como *in vitro* nos animais alimentados, a síntese de C^{14} -glicogênio foi mais elevada nas brânquias e no hepatopâncreas quando comparada àquela no tecido muscular. Esses resultados são concordantes com altas concentrações de glicogênio constatadas, por diversos autores, no hepatopâncreas e nas brânquias do caranguejo *C. granulata* (Kucharski e Da Silva, 1991^A e B; Vinagre e Da Silva, 1992; Nery e Santos, 1993).

Durante o processo de realimentação de 48 horas não foram constatadas, no hepatopâncreas e no músculo, variações significativas de incorporação do ^{14}C da glicose em glicogênio. Estes dados foram confirmados pelos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, nas brânquias o processo de realimentação diminuiu significativamente a síntese de glicogênio a partir de glicose-U- ^{14}C *in vivo*. Os resultados *in vitro* demonstram que a atividade dos sistemas enzimáticos pertinentes no tecido branquial, durante a

realimentação, seria suficiente para a utilização de glicose. Contudo, *in vivo*, os resultados sugerem que durante o processo de realimentação haveria um desvio do fluxo de carbonos da glicose para a síntese de lipídios no hepatopâncreas, o que levaria a uma redução da síntese de glicogênio nas brânquias.

A capacidade de síntese de ^{14}C -lipídeos, no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata*, foi bastante elevada quando comparada àquela em vertebrados. Esta alta atividade lipogênica do hepatopâncreas de *C. granulata*, confirma os resultados obtidos por Kucharski e Da Silva (1991b) que constataram valores de cerca de 20% de lipídios por grama de órgão. Em crustáceos, devido a ausência de um tecido adiposo bem desenvolvido, o hepatopâncreas seria o principal sítio de armazenamento de grandes quantidades de lipídeos neutros, chegando a 60% de seu peso total, em caranguejos terrestres (O'Connor e Gilbert, 1968; Morris e Airriess, 1998). Segundo Morris e Airriess (1998), os estoques de lipídeos no músculo e no hepatopâncreas são mobilizados conforme variações estacionais na composição das dietas e disponibilidade de alimento, e durante os processos de muda e gametogênese. No *Chasmagnathus granulata*, Kucharski e da Silva (1991^a) constataram uma diminuição nos níveis de lipídeos no hepatopâncreas durante o outono, coincidente com o final do período reprodutivo, sugerindo a participação dos lipídeos neste processo.

A concentração de glicose na hemolinfa dos animais alimentados e em jejum é semelhante, confirmando os dados obtidos por Oliveira (1993). Esta autora não constatou alterações significativas nos valores de glicose hemolinfática aos 21 dias de jejum, entretanto, a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo diminuíram significativamente, sugerindo que durante este período de restrição alimentar, a manutenção da glicemia no *C. granulata* ocorreria através da glicogenólise hepatopancreática e

muscular. Entretanto, a hipótese de uma menor utilização periférica de glicose durante o jejum não pode ser descartada.

Neste estudo, a glicina foi escolhida como precursor pois é um aminoácido que possibilita avaliar juntamente a via gliconeogênica e a síntese de proteínas. Com relação ao metabolismo da glicina, sabe-se que este aminoácido para passar à via neoglicogênica, transforma-se em serina e em seguida em piruvato, portanto, sua incorporação em glicose é mais lenta. O período de quatro horas utilizado neste trabalho talvez reflita o momento mais marcante da biossíntese de ^{14}C -glicose a partir de glicina-U- ^{14}C e sua incorporação em glicogênio no hepatopâncreas, músculo e brânquias. Todos os tecidos estudados foram capazes de converter a glicina-U- ^{14}C em glicogênio- ^{14}C , porém a taxa de incorporação foi menor que aquela a partir de glicose-U- ^{14}C . A comparação dos valores de síntese de glicogênio- ^{14}C nas brânquias e no hepatopâncreas, entre os animais alimentados e em jejum, não revelou diferenças significativas. Entretanto, no músculo a formação de ^{14}C -glicogênio diminuiu no grupo jejum. Esta redução da capacidade de síntese de glicogênio no músculo é concomitante com a diminuição nos níveis deste polissacarídeo observada neste tecido durante o jejum (Vinagre e Da Silva, 1992). Os dados obtidos *in vitro* sobre a incorporação do ^{14}C da glicina em glicogênio no músculo não demonstram uma redução da capacidade intrínseca de síntese durante o jejum. Estes resultados sugerem que a restrição alimentar, glicose- ^{14}C proveniente da neoglicogênese muscular seria utilizada como substrato energético, reduzindo assim sua incorporação em glicogênio. Esta hipótese é sustentada pelos resultados obtidos durante o processo de realimentação, quando ocorre um aumento significativo da síntese de glicogênio e da conversão ^{14}C -glicina em glicose no músculo com a oferta de alimento.

No hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata*, Oliveira (1993) constatou uma redução na conversão de L-alanina-U- C^{14} em glicose aos 21 dias de jejum. Utilizando como precursores alanina- C^{14} e ácido láctico- C^{14} , Oliveira e Da Silva (1997) constataram no hepatopâncreas desse caranguejo que a conversão de alanina- C^{14} em glicose era significativamente maior que aquela com lactato. Essas autoras comprovaram, também, que ao contrário do que ocorre em vertebrados a capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* não foi afetada pela composição da dieta. Em outros crustáceos, já foi comprovado que as brânquias (Thabrew e cols., 1971) e o músculo (Eichner e Kaplan, 1977; Lallier e Walsh, 1991) possuem atividade gliconeogênica.

A formação de proteínas- C^{14} a partir de glicina-U- C^{14} demonstra que os três tecidos estudados foram capazes de utilizar este aminoácido como precursor tanto para a síntese de glicose como para a síntese de proteínas. Schein (1999), utilizando como precursor leucina-U- C^{14} , não constatou diferenças significativas da capacidade de síntese de proteínas, nesses mesmos tecidos, entre caranguejos *C. granulata* alimentados com as dietas RC ou RP. No presente trabalho, a síntese de proteínas não foi afetada pelo jejum em nenhum dos tecidos estudados. Vinagre e Da Silva (1992), também, não constataram alterações significativas dos níveis de proteínas teciduais até quatro semanas de jejum. Contudo, durante o processo de realimentação constata-se uma diminuição significativa da capacidade de síntese de proteínas a partir de glicina-U- ^{14}C . Como a glicina também é um aminoácido gliconeogênico e durante a realimentação ocorreu, no músculo, um aumento da incorporação e da conversão do ^{14}C da glicina em glicogênio e glicose, respectivamente, a síntese de proteínas a partir deste aminoácido estaria reduzida. Serão necessários experimentos utilizando leucina-U- ^{14}C para melhor avaliar a síntese de proteínas nos tecidos.

Além dos fatores nutricionais, hormônios como o hiperglicêmico e substância similar à insulina/IGF devem estar modulando os processos endergônicos de síntese no caranguejo *Chasmagnathus granulata*, como já foi constatado em outros crustáceos (Santos e Keller, 1993b; Kucharski e cols., 1998; Morris e Airriess, 1998).. .

II. EFEITO DA ABLAÇÃO BILATERAL DOS PEDÚNCULOS OCULARES SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DURANTE O PROCESSO DE ADAPTAÇÃO AO ESTRESSE HIPOSMÓTICO

A importância da composição da dieta sobre a concentração de glicose hemolinfática e a regulação das reservas de lipídeos e carboidratos no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, já havia sido demonstrada em trabalhos realizados por Kucharski e Da Silva (1991 a), Vinagre e Da Silva (1992) e Oliveira e Da Silva (1997).

No presente trabalho, as brânquias anteriores e posteriores foram estudadas separadamente devido à suas diferenças funcionais: as brânquias anteriores são respiratórias enquanto as posteriores são osmorreguladoras (Trausch e cols., 1989). Comparando-se os valores de glicogênio entre as duas brânquias, constata-se que, ao contrário do que ocorre em outros tecidos, a composição das dietas administradas aos animais não altera as reservas deste polissacarídeo. Também, a comparação entre os valores de glicose livre nas brânquias anteriores e posteriores de animais mantidos com as dietas RC ou RP não demonstra diferença significativa. Resultado semelhante já havia sido obtido por Schein (1999) e Oliveira (1998).

Dois dias após a remoção bilateral dos pedúnculos oculares, os valores de glicose na hemolinfa diminuíram 30% nos caranguejos alimentados com a dieta RP e 60% naqueles do grupo RC. O efeito da ablação bilateral dos pedúnculos oculares foi anteriormente demonstrado no caranguejo *Chasmagnathus granulata* por Santos e Colares (1986) e Santos e cols. (1988) em animais alimentados com uma dieta de carne bovina. No primeiro trabalho, não foram verificadas alterações significativas nos valores de glicose hemolinfática até 96 horas após a cirurgia. Entretanto, no segundo trabalho, foi constatada uma redução significativa (60%) dos níveis de glicose na hemolinfa 24 horas após a

remoção bilateral dos pedúnculos oculares. Os autores atribuíram esta diferença entre os dois trabalhos à utilização de técnicas distintas de determinação de glicose.

Em outros crustáceos, a ablação bilateral dos pedúnculos oculares, também afetou os níveis de glicose na hemolinfa. Por exemplo, em *Uca pugilator* (Rothe e cols., 1991) e em *Procambarus clarkii* (Sarojini e cols., 1995) foram verificadas reduções significativas dos valores de glicose na hemolinfa após a ablação dos pedúnculos oculares, entretanto, em *Carcinus maenas* (Lüschen e cols., 1993) foi constatada uma hiperglicemia transitória com retorno aos valores pré-operatórios dois dias após a cirurgia.

Neste trabalho após a ablação dos pedúnculos oculares, os animais eram normalmente alimentados com as respectivas dietas até (48 horas) o início do estresse osmótico. A apedunculacão aumentou a concentração de glicose livre nas brânquias anteriores. Talvez, este aumento reflita uma diminuição da atividade da via glicolítica pela falta do CHH.

Os outros parâmetros determinados não foram alterados significativamente após 48 horas da ablação bilateral dos pedúnculos oculares tanto nos caranguejos mantidos com a dieta RC como com a RP.

Os resultados em caranguejos íntegros aqui apresentados possibilitam identificar, em *C. granulata* alimentados com a dieta RP, características da resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico que contrastam com aquelas observadas nos animais com a dieta RC. A importância da composição da dieta sobre a regulação do metabolismo de carboidratos durante o estresse hiposmótico nesse animal, já havia sido demonstrada por Da Silva e Kucharski (1992) e Oliveira e Da Silva (1999).

Nos animais intactos alimentados com a dieta RP os valores de glicose na hemolinfa diminuíram significativamente às 3 horas de estresse, entretanto, a partir das 9 horas retornaram a valores semelhantes aos iniciais e mantiveram-se constante até o final do

estresse osmótico. Já nos caranguejos intactos alimentados com a dieta RC, os valores de glicose hemolinfática não se alteraram ao longo do estresse hiposmótico. Nos dois grupos (RP e RC) a constância nos níveis de glicose circulante foi mantida através de uma intensa glicogenólise muscular e de uma mobilização das reservas de glicogênio e glicose livre do hepatopâncreas. No grupo RP a glicogenólise muscular iniciou mais precocemente que no caranguejos alimentados com a dieta RC. O consumo do glicogênio muscular, durante as primeiras horas de estresse hiposmótico, parece indicar que, nos animais alimentados com a dieta RP, o lactato derivado dos polissacarídeos musculares seria uma importante fonte de carbonos para o processo de neoglicogênese. Oliveira e Da Silva (1999) constataram que a conversão do ácido láctico- ^{14}C em glicose às 24 horas de estresse foi semelhante aquela no grupo controle, entretanto, às 72 e 144 horas diminuiu significativamente. Tais resultados são concordantes com os achados deste trabalho, pois no final do período experimental, os níveis de glicogênio muscular estão muito reduzidos.

Da Silva e Kucharski (1992) demonstraram que em *C. granulata* alimentado com a dieta rica em proteínas, o estresse hiposmótico de 72 horas reduzia drasticamente a glicose circulante e aumentava a concentração de glicogênio no hepatopâncreas, porém não alterava as reservas deste polissacarídeo no músculo. Em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos e submetidos ao mesmo protocolo experimental, esses autores constataram reduções significativas dos níveis de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo e elevação dos níveis de glicose na hemolinfa. Nesse trabalho os autores aclimataram previamente os animais a uma salinidade de 10‰. Nos experimentos descritos nesta tese, os caranguejos foram mantidos antes do início do estresse hiposmótico a 20‰. Talvez, a mudança mais drástica de salinidade tenha exigido um esforço

adaptativo maior, levando a um outro padrão de resposta metabólica diverso daquele constatado com 10‰. Foram escolhidas 20‰ de salinidade, com o objetivo de aproximação do ponto isosmótico dessa espécie, que corresponde a 28,5‰ no inverno e 30‰ no verão (Bromberg, 1992).

Nas brânquias tanto anteriores como posteriores, quanto ao conteúdo de polissacarídeos, não foram constatadas diferenças entre os caranguejos alimentados com a dieta RC ou RP. Parece que, ao contrário do que acontece no hepatopâncreas e no músculo de caranguejos mantidos com as dietas RC ou RP, o glicogênio e a glicose livre das brânquias, tanto nas posteriores como nas anteriores, não é afetado pela composição das dietas. Tais resultados levam à suposição de que o controle do metabolismo de carboidratos nas brânquias seria diferente daquele observado no músculo e no hepatopâncreas. A alta concentração de glicogênio nas brânquias está de acordo com os resultados de Nery (1990) e de Vinagre e Da Silva (1992) em trabalhos com a mesma espécie.

Os principais mecanismos desenvolvidos nos crustáceos, que permitem que os animais adaptem-se com sucesso às variações de salinidade do meio ambiente, são alteração na permeabilidade à água, captação e excreção ativa de íons na superfície corporal, principalmente, nas brânquias, intestino e glândula antenal. A captação ativa de íons requer a ativação das enzimas ATPase Na^+/K^+ e anidrase carbônica, sobretudo, nas brânquias (Mantel, 1985). Além desses mecanismos, alterações nos níveis de aminoácidos circulantes e intracelulares, também são importantes durante o processo de osmorregulação (Bishop e Burton, 1993). Em invertebrados, sabe-se que os aminoácidos livres contribuem com aproximadamente 50% da pressão osmótica intracelular (Pierce, 1971; Gilles, 1982; Robertson e cols., 1992; Bishop e Burton, 1993; Gilles, 1997). Postula-se que as respostas fisiológicas do metabolismo de compostos nitrogenados ao processo de osmorregulação

seriam alterações da relação entre síntese/degradação de aminoácidos livres, no transporte desses aminoácidos pelas membranas plasmáticas e pelo “turnover” de proteínas, que serviriam como reservas desses aminoácidos (Schoffeniel, 1976; Gilles, 1982; Gilles, 1997).

Entre os principais efetores orgânicos osmoticamente ativos em crustáceos destaca-se a arginina, a alanina, a glicina, a prolina, o ácido glutâmico e a taurina. Contudo, a contribuição relativa de cada aminoácido aos ajustes osmóticos pode variar marcadamente entre as espécies e entre os diversos tecidos de uma mesma espécie (Huggins e Munday, 1968; Bowlus e Somero, 1979; Chang e O’Connors, 1983; Mantel e Farmer, 1983; Bishop e Burton, 1993).

Durante o estresse hiposmótico, tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores dos animais íntegros alimentados com a dieta RP, ocorre às 3 horas um aumento significativo da concentração de glicogênio, entretanto, no final do período experimental constata-se uma redução marcante dos valores deste polissacarídeo. No grupo RC nas brânquias anteriores os níveis de glicogênio reduzem-se marcadamente no final do período de estresse. Entretanto, nas posteriores a concentração deste polissacarídeo aumenta entre às 9 e 20 horas experimentais. Talvez o aumento dos níveis de glicogênio às 3 horas de estresse, em ambas as brânquias com a dieta RP e na branquia posterior na RC, ocorra devido a uma ativação da via gliconeogênica como uma forma de diminuir a concentração intracelular de aminoácidos livres e fornecer glicose livre. Diversos estudos têm demonstrado que, durante o estresse hiposmótico, a concentração de aminoácidos livres nos tecidos diminui (Tan e Choong, 1981; Gilles, 1997). A atividade neoglicogênica em brânquias de crustáceos já foi demonstrada por Thabrew e cols. em 1971.

Nos animais íntegros alimentados com a dieta RC não foram constatadas variações significativas dos valores de glicose livre ao longo do estresse hiposmótico nas brânquias anteriores. Contudo, nas brânquias posteriores ocorreram reduções significativas somente no início (3 horas) e no fim (144 horas) do estresse osmótico. Nos outros tempos os valores mantiveram-se semelhantes aos iniciais, correspondendo ao momento do aumento da concentração de glicogênio, devida, talvez, à ativação da via neoglicogênica.

Com relação aos valores de glicose livre nas brânquias dos caranguejos intactos mantidos com a dieta RP, observa-se uma diminuição significativa no final do período experimental nas posteriores e no início nas anteriores.

A glicose livre resultante da mobilização das reservas de carboidratos e a fornecida via gliconeogênese seriam utilizadas como substrato energético pelo próprio tecido branquial durante a adaptação ao meio diluído. Não foram constatadas diferenças significativas no padrão de resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico, entre as brânquias anteriores e posteriores.

No presente trabalho, o papel do CHH sobre o padrão de resposta do metabolismo de carboidratos durante o estresse hiposmótico foi investigado através da ablação de ambos os pedúnculos oculares.

O hepatopâncreas foi identificado por Sedlmeier (1987) como tecido-alvo do CHH, que no lagostim *Orconectes limosus* inibiria a síntese de glicogênio. Além do hepatopâncreas, outros tecidos como os hemócitos (Johnston e Davies, 1972; Santos e Stefanelo, 1991), o tecido muscular, o tegumento (Keller e Andrew, 1973; Santos e cols., 1988), as gônadas e as brânquias (Morriss e Airiess, 1998) seriam alvo da ação do CHH. Acredita-se que o CHH exerça seu efeito hiperglicêmico, ativando a glicogenólise no tecido alvo, como constatado por Keller e Andrew (1973) nos tecidos tegumentar e gonadal de *Uca pugilator*

e no tecido tegumentar e branquial de *Orconectes limosus*, após a injeção de extratos de pedúnculos oculares. Entretanto, nestes animais não foram verificadas alterações dos níveis de glicogênio hepatopancreático. Posteriormente, Sedlmeier (1988) conseguiu comprovar, *in vitro*, que o CHH diminuía, no hepatopâncreas, a síntese de glicogênio a partir de glicose-U-C¹⁴. Desta forma, a falta do CHH por ablação dos pedúnculos oculares, diminuiria a mobilização das reservas de carboidratos durante o estresse hiposmótico, reduzindo o fornecimento de glicose para os processos ativos de osmorregulação. Santos e cols. (1988), também postularam que o CHH exerceria seu efeito hiperglicêmico diminuindo a utilização de glicose pelos tecidos.

A comparação entre os padrões de resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico de animais controles e apedunculados, alimentados com as dietas RC ou RP, não demonstra uma alteração significativa dos parâmetros avaliados nos caranguejos sem pedúnculo ocular. Esses resultados revelam que apesar da ablação bilateral dos pedúnculos oculares, os animais foram capazes de aumentar a concentração de glicose na hemolinfa, atingindo valores semelhantes aqueles dos caranguejos íntegros e mobilizar as reservas de glicogênio.

Considerando que, durante o choque hiposmótico, a concentração de aminoácidos livres diminua, os mesmos poderiam estar sendo utilizados na via gliconeogênica, o que explicaria o aumento da concentração de glicose livre no hepatopâncreas e de glicogênio nas brânquias anteriores dos caranguejos alimentados com a dieta RP, assim como de glicogênio nas brânquias posteriores daqueles mantidos com a dieta RC. Estes resultados levam à suposição que o CHH não teria um papel controlador sobre a via neoglicogênica durante o estresse hiposmótico. Entretanto, estudos mais aprofundados e específicos serão necessários para a confirmação.

Apesar da ablação bilateral dos pedúnculos oculares, é mantido o padrão de resposta diferencial ao estresse hiposmótico, entre os animais alimentados com as dietas RC ou RP.

Para a explicação desses resultados, hipóteses podem ser levantadas: o CHH não seria o único hormônio hiperglicêmico e mobilizador das reservas de carboidratos; haveria outra fonte de liberação do hormônio além do pedúnculo ocular; as 48 horas não foram suficientes para esgotar as reservas circulantes de hormônio (talvez permaneça CHH ligado à proteínas hemolinfáticas); o CHH no *C. granulata* parece não estar envolvido no processo de osmorregulação como foi proposto para os crustáceos.

A hipótese de que o CHH possa ser produzido fora do sistema órgão X- Glândula do Seio até pouco tempo era considerada pouco provável (Keller, 1992). Porém, recentemente, Kleijn e cols. (1995) identificaram o RNAm do CHH no sistema nervoso ventral da lagosta *Homarus americanus*. Essa constatação é reforçada pela presença, de um outro grupo de hormônios produzidos pelo sistema órgão X- Glândula do Seio, a família de peptídeos PDH/PDF (hormônio dispersador de pigmentos/ hormônio concentrador de pigmentos), em várias partes do sistema neuroendócrino de crustáceos (Nery, 1999). Recentemente, Chang e cols. (1998), através da técnica de ELISA, obtiveram valores de $1,8 \pm 1,6$ fmol/ml de CHH em animais apedunculados 3 meses após a cirurgia.

A hipótese de que o CHH não seja o único hormônio envolvido no controle dos níveis circulantes de glicose vem de descrições encontradas na literatura, de que moléculas como as monoaminas e peptídeos opiáceos, teriam um efeito sobre os níveis circulantes de glicose. Vários trabalhos mostram que a administração desses peptídeos e monoaminas alteraram os níveis de glicose circulantes. As evidências sugerem que estas moléculas podem alterar o níveis hemolinfáticos de glicose, tanto agindo sobre tecidos de reserva

como modulando a liberação de CHH (Morris e Airriess, 1998; Fingerman e cols., 1994; Lüschen e cols., 1991).

Além do pedúnculo ocular, o órgão pericárdico, principal local de produção de monoaminas, parece estar envolvido no processo de osmorregulação por ativação da ATPase Na^+/K^+ (Morris e Edwards, 1995). Trausch e cols. (1995), verificaram a presença de receptores de serotonina e dopamina nas brânquias posteriores do caranguejo *Eriocheir sinensis* e o envolvimento destas monoaminas na ativação da ATPase Na^+/K^+ , via aumento nos níveis intracelulares de AMPc. Sommer e Mantel (1991) verificaram que a dopamina é capaz de aumentar os níveis de AMPc tanto em brânquias anteriores como em brânquias posteriores de *Carcinus maenas* e este segundo mensageiro aumenta a atividade da ATPase Na^+/K^+ . Estes autores também verificaram que 24h após a transferência dos caranguejos para um meio diluído, os níveis de AMPc nas brânquias anteriores e posteriores aumentavam, indicando a importância deste mensageiro na adaptação ao estresse osmótico. Este efeito estimulador da dopamina e do AMPc sobre a atividade da ATPase Na^+/K^+ branquial, também foi constatado no caranguejo *Leptograpsus marmoratus* por Morris e Edwards (1995).

Segundo Charmantier-Daures e cols. (1994), o balanço de água e sais parece ser controlado por centros neuroendócrinos localizados no gânglio cerebral, pedúnculo ocular, massa ganglionar torácica ou sistema nervoso ventral. De acordo com esses autores, a falta do pedúnculo ocular quando o animal está hiperregulando em meio de baixa salinidade, leva à diminuições nas concentrações hemolinfáticas de Na^+ e/ou Cl^- com aumento no conteúdo de água, conseqüentemente, redução da osmolaridade hemolinfática total. A injeção de extratos de sistema nervoso central ou a implantação de tecido do pedúnculo ocular nesses crustáceos, restaura a regulação osmótica. Quando os autores testaram o

efeito da injeção de diferentes frações de extratos de pedúnculo ocular separadas por HPLC, constataram que, pelo menos uma das isoformas de CHH também parece estar envolvida na capacidade osmorreguladora (diferença entre a osmolaridade da hemolinfa e a do meio) da lagosta *Homarus americanus*. No caranguejo *Pachygrapsus marmoratus*, Eckhardt e cols (1995) identificaram um fator peptídico extraído do pedúnculo ocular, com 5000kDa e características bioquímicas muito semelhantes àquelas dos peptídeos da família do CHH, que seria capaz de alterar a atividade da ATPase Na^+/K^+ e a captação de Na^+ nas brânquias posteriores.

Apesar de os animais, tanto intactos como apedunculados, terem permanecidos em jejum ao longo do estresse hiposmótico de seis dias, os resultados descritos neste trabalho refletem o esforço adaptativo ao estresse osmótico e não ao jejum. Vinagre e Da Silva (1992) e Oliveira (1993), estudando o efeito do jejum longo e curto, respectivamente, em um protocolo experimental semelhante, encontraram um padrão de reposta metabólica diferente ao constatado neste estudo.

Ao final deste trabalho um campo de investigação foi aberto sobre os fatores controladores do metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata* e o papel destas substâncias no processo de osmorregulação.

III. EFEITO ADMINISTRAÇÃO DO MEIO DE INCUBAÇÃO DOS PEDÚNCULOS OCULARES SOBRE A GLICOSE HEMOLINFÁTICA DE CARANGUEJOS INTACTOS OU APEDUNCULADOS ALIMENTADOS COM AS DIETAS RC OU RP

O efeito hiperglicêmico da injeção de extratos de pedúnculo ocular em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com carne bovina, foi constatado por Santos e cols. (1988) e por Santos e Stefanello (1991). A administração de CHHs purificados de *Carcinus maenas* e *Orconectes limosus* em *C. granulata*, também causou hiperglicemia neste caranguejo. (Nery e cols.,1993).

Nos caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com a dieta RC, a administração do meio resultante da incubação de 4 pedúnculos oculares em solução Ringer, provocou hiperglicemia, tanto em animais intactos como naqueles apedunculados, embora, os níveis prévios de glicose circulantes estivessem bastante elevados. Nos animais do grupo RC apedunculados, os níveis de glicose circulante 120 minutos após a administração do meio, atingiram valores 2 vezes maiores que aqueles do grupo intacto. Talvez, a retirada prévia do CHH através da ablação bilateral, tenha aumentado o número e/ou a afinidade dos receptores ao hormônio, o que levaria a um incremento do efeito biológico nesse grupo experimental. Esse tipo de modulação foi constatada, por exemplo, para a insulina em diversas classes de vertebrados.

Por outro lado, nos caranguejos alimentados com a dieta RP, a administração do meio resultante da incubação de 4 pedúnculos oculares não alterou significativamente os valores

de glicose na hemolinfa. Para a obtenção de efeito hiperglicêmico nesse grupo de animais, foi necessário administrar meio oriundo da incubação de 8 ou 12 pedúnculos de animais RP. Assim como ocorreu nos animais do grupo RC apedunculado, nos caranguejos alimentados com a dieta RP e que sofreram ablação, a sensibilidade dos tecidos alvo à ação do CHH foi maior que no grupo intacto, contudo, a magnitude do efeito foi menor nos animais mantidos com carne bovina. Talvez, a administração prévia de uma dieta RP, levaria a um aumento da resistência periférica à ação do hormônio CHH. Com isso, a síntese e liberação do hormônio aumentaria, explicando a necessidade de incubar maior número de pedúnculos oculares para a obtenção de um efeito hiperglicêmico.

Esses resultados sugerem que nos animais alimentados com a dieta RC, devido a alta concentração de glicose na hemolinfa, a liberação do CHH estaria inibida o que levaria a um maior acúmulo de hormônio no pedúnculo. A hipótese de que a concentração de glicose hemolinfática controla a secreção de CHH foi proposta por Santos e Keller (1993a), a partir da observação de que aumentos nos níveis de glicose circulantes diminuem a concentração hemolinfática de CHH em *Carcinus maenas*. Em 1990, Keller e Orth verificaram em *Orconectes limosus* que, após seis dias de jejum, os níveis circulantes de glicose diminuem e os de CHH aumentam. Recentemente, Glowik e cols. (1997) observaram que a glicose causa hiperpolarização em neurônios secretores de CHH, inibindo assim, a sua liberação. Entretanto, a hipótese de uma maior sensibilidade dos tecidos ao CHH nos animais alimentados com a dieta RC, também não pode ser descartada.

Foi identificado por eletroforese de poliacrilamida (SDS-PAGE) colorido com azul de Coomassie, nos meios de incubação utilizados, uma proteína com peso molecular de aproximadamente 9Kda (Vinagre e Da Silva, 1998). A massa molecular dos CHHs de

diferentes espécies de crustáceos varia entre 5,7 a 8,7 kDa (Smullen e cols., 1996). No lagostim *Procambarus clarkii*, Huberman e Aguillar (1986), identificaram a presença de três isoformas de CHH após purificação com HPLC. Dos três picos, o B e o C apresentaram atividade hiperglicêmica. O peptídeo B, por ser o mais abundante, foi escolhido para a purificação com SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15% colorido com azul de Coomassie, sendo identificada uma banda de aproximadamente 6kDa.

Experimentos com administração de meios de incubação oriundos de animais RP em caranguejos mantidos com a dieta RC e vice versa, e a determinação dos valores de glicose hemolinfática e de glicogênio e glicose livre em diferentes tecidos, serão necessários. Contudo, os resultados sugerem que a composição da dieta administrada ao animal seria um fator controlador da liberação do hormônio e da sua utilização periférica.

IV. EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE MONOAMINAS SOBRE A GLICEMIA DE CARANGUEJOS INTACTOS E APEDUNCULADOS ADAPTADOS A DIETA RICA EM CARBOIDRATOS OU RICA EM PROTEÍNAS

As respostas fisiológicas dos crustáceos à administração de monoaminas implicam em uma complexa rede de interações em vários sistemas controladores. As descrições sobre o envolvimento das monoaminas na regulação dos níveis circulantes de glicose em crustáceos são conflitantes. Elas podem controlar a concentração de glicose hemolinfática diretamente, agindo sobre sítios periféricos de armazenamento de carboidratos ou, indiretamente, através de receptores específicos na glândula do seio, controlando a liberação de seus hormônios. A interrelação entre esses neuro- hormônios e o CHH deve contribuir na determinação dos níveis basais de glicose circulante, em resposta a alterações fisiológicas dos fatores ambientais (Morris and Airriess, 1998).

Em caranguejos *Chasmagnathus granulata* intactos ou apedunculados, alimentados com as dietas RC ou RP, a administração de serotonina elevou de forma dose - dependente os níveis circulantes de glicose. Esses resultados foram semelhantes aos já descritos para várias espécies de crustáceos (Bauchau e Mengeot, 1966; Keller e Beyer, 1968; Bauchau e cols., 1968; Strolenberg e Van Herp, 1977; Martin, 1978; Fingerman e cols., 1981; Morriss e Airriess, 1998).

A capacidade de neuro - hormônios monoaminérgicos em aumentar os níveis circulantes de glicose de crustáceos biapedunculados parece ser controversa, ou pelo menos, espécie - específica (Morris e Airriess, 1998). Em alguns casos, a injeção de serotonina causou hiperglicemia em animais apedunculados como no *Carcinus maenas* (Bauchau e Mengeot, 1966; Lüschen e cols., 1993) e no *Gecarcoidea natalis* (Morris e

Airriess, 1998). Entretanto, no *Orconectes limosus* (Keller e Beyer, 1968) a injeção de serotonina não alterou os valores glicêmicos de animais apedunculados. Glowik e cols. (1997), estudando o controle da liberação de CHH de *Cancer borealis*, verificaram efeito inibitório da serotonina sobre a atividade elétrica dos neurônios liberadores deste hormônio, diminuindo o disparo de potenciais de ação.

A administração de dopamina causou elevação do valores de glicose na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata* intactos alimentados com a dieta RC ou RP. A dose mais efetiva foi de $5,3 \times 10^{-7}$ moles/caranguejo produzindo efeito a partir dos 30 minutos experimentais. No caranguejo *Carcinus maenas* também foi verificado efeito semelhante (Lüschen e cols., 1993), contudo, no lagostim *Procambarus clarkii* (Sarojini e cols., 1995) foi constatado um efeito hipoglicemiante dose - dependente, bloqueável pelo antagonista dopaminérgico espiperone.

Nos caranguejos *Chasmagnathus granulata* apedunculados alimentados com a dieta RP, a dopamina não alterou os valores circulantes de glicose. Contrariamente, no grupo alimentado com a dieta RC a dopamina elevou os níveis de glicose circulantes. O mesmo resultado foi observado por Lüschen e cols. (1993) e Sarojini e cols. (1995) no caranguejo *Carcinus maenas* e no lagostim *Procambarus clarkii*, respectivamente. Em estudo *in vitro* Sarojini e cols. (1995) verificaram que, quando os pedúnculos oculares eram incubados em meio contendo dopamina, a liberação de CHH diminuía. Entretanto, Glowik e cols. (1997), verificaram que os neurônios secretores de CHH de *Cancer borealis* não repondem ao estímulo da dopamina.

As observações de Glowik e cols. (1997) sobre os efeitos da dopamina e da serotonina sobre neurônios secretores de CHH, apesar de serem conflitantes com a maioria das observações feitas por outros autores, poderiam ser melhor compreendidas considerando o

fato de que muitas vezes, as respostas *in vitro* são diferentes daquelas *in vivo*. Nos experimentos *in vivo*, a administração das monoaminas, provavelmente, desencadeia uma série de mecanismos contrarregulatórios neuro - humorais que no caso dos experimentos *in vitro* são isolados (Morriss e Airriess, 1998).

Nesta análise sobre como as monoaminas controlariam o nível de glicose circulante em crustáceos, deve-se levar em conta os seus efeitos sobre o sistema cardiovascular. Conforme Morris and Airriess (1998), o CHH, as aminas e outros peptídeos da glândula do Seio são secretados para a hemolinfa via artérias óptica e oculomotor. Esses vasos aparecem como ramos pareados da aorta anterior e da artéria anterolateral, respectivamente, desta forma, mudanças na perfusão arterial podem afetar o fluxo de hemolinfa nestas artérias e com isso afetar a distribuição, modulando a atividade, dos hormônios liberados pela glândula do Seio. As monoaminas em geral costumam ter efeitos cardioexcitatórios, a serotonina e a octopamina por exemplo, agem sobre o débito cardíaco e a redistribuição da hemolinfa, podendo assim afetar a distribuição do CHH e com isso, afetar a glicemia.

Em *Cancer magister* por exemplo, há um aumento abrupto na perfusão da aorta anterior no início da emersão e o mesmo ocorre após infusão pericárdica com octopamina. Após seis horas de emersão, ocorre hiperglicemia. Sabendo-se que a aorta anterior supre hemolinfa para a glândula do Seio, pode-se sugerir que mudanças na perfusão arterial, ocasionadas por octopamina, podem ser parte de uma resposta integrativa, facilitando a secreção de CHH da glândula do Seio e/ou sua distribuição para os tecidos - alvo periféricos, ocasionando, assim a hiperglicemia (Morris and Airriess, 1998). A hiperglicemia após injeção de octopamina foi observada, também, por Lüschen e cols. (1993) no *Carcinus maenas*.

Além do efeito hiperglicêmico, em *Chasmagnathus granulata*, a serotonina (em todas as doses utilizadas) causou grande rigidez muscular acompanhada de flexão nos membros e abdômen, como descrita em lagostas e lagostins (Betlz, 1988; Fingerman, 1994) e no siri *Callinectes sapidus* (Wood, Gleeson e Derby, 1995), confirmando sua importância no controle da postura em crustáceos.

A injeção de dopamina também causou rigidez muscular porém a postura alterou-se de forma inversa, ocorrendo extensão dos membros. Em *Callinectes sapidus*, o mesmo efeito e uma intensa ativação das peças bucais, produzindo correntes de água, foram constatados. Reações semelhantes foram observadas durante o comportamento de acasalamento desta espécie (Wood e Derby; Wood, Gleeson, Derby; Wood; 1995).

Pode-se concluir que ambas as aminas estudadas são capazes de causar hiperglicemia no *Chasmagnathus granulata*, independentemente da dieta administrada ao animal. Porém os efeitos dessas aminas sobre animais apedunculados são muito variáveis conforme a espécie estudada, tornando difícil dizer se elas realmente interferem na liberação de CHH. A fim de esclarecer melhor esta questão, estudos *in vitro* incubando-se pedúnculos oculares em meios contendo serotonina ou dopamina são necessários. Outro ponto importante que deve ser investigado é a caracterização dos receptores aminérgicos em crustáceos pois, segundo Morriss e Airriess (1998), apesar dessas moléculas já terem sido bem estudadas e identificadas em várias espécies desse grupo, muito pouco se sabe a respeito de seus receptores: quantos tipos existem, sua localização e quais os sistemas de segundo-mensageiro envolvidos em seus efeitos biológicos.

CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho, podemos concluir que:

1. Durante o período de 3 semanas de jejum, a glicose proveniente da gliconeogênese muscular seria utilizada como substrato energético por caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com a dieta RP. Durante a realimentação, o C¹⁴ da glicose seria desviado da síntese de glicogênio para a síntese de lipídeos.
2. A dieta previamente administrada aos caranguejos determina diferentes padrões de resposta do metabolismo de carboidratos durante a adaptação ao choque osmótico. As poucas diferenças encontradas entre animais intactos e apedunculados, tanto do grupo RC como RP, sugerem que durante o choque hiposmótico, outros hormônios além do CHH, possam estar envolvidos no controle dos níveis circulantes de glicose, ou, que exista alguma fonte de CHH fora do complexo órgão X-glândula do seio.
3. O estudo do efeito dos meios de incubação dos pedúnculos oculares sobre os níveis circulantes de glicose favorece a hipótese de que a concentração circulante de glicose controlaria a liberação de CHH e a sua utilização periférica.
4. A serotonina, por apresentar efeito hiperglicêmico tanto em caranguejos intactos como naqueles apedunculados, parece agir de forma independente do hormônio CHH. O fato de a dopamina não ter alterado os níveis circulantes de glicose em caranguejos apedunculados do grupo RP mas ter causado hiperglicemia nos apedunculados RC, mostra que mais estudos são necessários para esclarecer o seu papel sobre o controle da glicemia nestes animais.

5. As alterações posturais observadas após a administração destas monoaminas sugerem que elas tenham um papel importante no controle da postura em crustáceos, como proposto por Fingerman e Nagabushanam em 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramowitz, A. A.; Hisaw, F.L.; Papandrea, D.N. (1944). The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. **Biol. Bull.**86:1-5.
- Bauchau, A. G.; Mengeot, J. C.; Olivier, M. A. (1968). Action de la sérotonine et de l'hormone diabétogène des crustacés sur la phosphorylase musculaire. **Gen. Comp. Endocrinol.** 11:132-138.
- Bauchau, A. G.; Mengeot. (1966). Sérotonine et glycémie chez les Crustacés. **Experientia** 22:238-239.
- Beltz, B. (1988). Crustacean neurohormones. In: **Endocrinology of Select Invertebrate Types**, Laufer, H. and Downer, R.G.H. (eds.), p.235-258. Alan R. Liss, Inc.
- Bishop, S. H.; Burton, R. S. (1993). Aminoacid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. **Comp. Biochem, Physiol.** 106A(1):49-56.
- Bliss, D. E. (1951). Metabolic Effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab, *Gecarcinus lateralis*. **Anat. Rec.** 111: 502-503. (Abstr.).
- Boschi, E.E. (1964). Los crustaceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. **Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)**, 6:1-76.
- Botto, J.L. and Irigoyen, H.P.(1980) Bioecología de la comunidad del cangrejal I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del río Salado, provincia de Buenos Aires. **Sem.latinam.Ecol.Bentónica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur, Unesco- Montevideo** :161-169.

- Bowlos, R.D.; Somero, G.N. (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the selection of osmotic agents and end products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **J. Exp. Zool.**, **268**: 151-161.
- Branco, J. O. (1990). Aspectos ecológicos dos Brachyura (Crustacea, Decapoda) no manguezal do Itacorubi, SC-Brasil. **Revta. bras. Zool.** **7(1-2)**:165-179.
- Brogim R. A. and Lana P. C. (1997). Espectro alimentar de *Aratus pisonii*, *Chasmagnathus granulata* and *Sesarma rectum* (Decapoda, Grapsidae) em um manguezal da Baía de Paranaguá, Paraná. **Iheringia** **83**:35-43.
- Bromberg, E. (1992). **Dinâmica osmótica e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão.** Rio Grande: FURG, 1992. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica)- Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Calder, P., Geddes, R. (1992). Heterogeneity of glycogen synthesis upon refeeding following starvation. **Int. J. Biochem.** **24 (1)**:71-77.
- Carr, R.S.; Neff, J.M. (1984). Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. **Comp. Biochem. Physiol.**, **77B (3)**:447-449.
- Cervino, C.O.; Luquet, C.M.; Haut, G.E.; Rodriguez, E.M. (1996). Preferências de salinidade do caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulata* (Dana. 1851) após longo período de aclimação. **Atlantica** **18**:69-75.
- Chang, E. S.; Keller, R.; Chang S. (1998). Quantification of crustacean hyperglycemic

- hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. **Gen. Comp. Endocrinol.** **111**: 359-366.
- Chang, E.; O'Connors, J.D. (1983). Metabolism and Transport of carbohydrates and lipids. In : Bliss, D.E. (ed.), **The Biology of Crustacea**. Academic Press, New York, p. 263-289.
- Charmantier, G.; Charmantier-Daures, M.; Aiken, D. E. (1984). Neuroendocrine control of hydromineral regulation in the american lobster *Homarus americanus* H. Milne-Edwards 1837. **Gen. Comp. Endocrinol.** **54**:8-19.
- Charmantier-Daures, M.; Charmantier, G.; Janssen, K.P.C.; Aiken, D.E.; Van-Herp, F. (1994). Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** **94 (3)**:281-293.
- 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. **Comp. Biochem. Physiol.** **101A (3)**:631-634.
- Da Silva, R.S.M., Migliorini, R. H. (1991). Effects of starvation and refeeding on energy-linked metabolic processes in turtle (*Phrynops hilarii*). **Comp. Biochem. Physiol.** **96A (3)**:415-419.
- De Kleijn, D.P.V.; Leeuw, E.P.H.; Van den Berg, M.C.; Mrtens, G.J.M.; Van Herp, F. (1995). Cloning and expression of two mRNAs encoding different crustacean hyperglycemic hormones in the lobster *Homarus americanus*. **Biochim. Biophys. Acta**

1260:62-66.

- D'Incao, F.; Ruffino, M.L.; Silva, K.G. (1988). Notas preliminares sobre a ecologia e *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). In: **Resumos XV Congresso Brasileiro de Zoologia. Curitiba-PR.**
- D'Incao, F.; Ruffino, M.L.; Silva, K.G.; Braga, A.C. (1990). Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra de Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Atlântida 12 (2):85-93.**
- Drach, F.; Tchernigovtzeff, C. (1967). Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu, 161:595-607.**
- Eichner, R.D.; Kaplan, N.O. (1977). Catalitic proprieties of lactate dehydrogenase in *Homarus americanus*. **Arch. Biochem. Biophys., 181: 501-507.**
- Eckhardt, E.; Pierrot, C.; Charmantier-Daures, M.; Trilles, J. P.; Charmantier, G. (1995). Stimulation of osmoregulation processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. **Gen. Comp. Endocrinol. 99:169-177.**
- Fingerman, M. (1997). Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. **Physiol. Zool. 70(3):257-269.**
- Fingerman, M.; Hamamurte, M. M.; Fingerman, S. W.;Reinschmidt, D. C. (1981). Effects of norepinephrine and norepinephrine agonists and antagonists on the melanophores of the fiddler crab *Uca pugillator*. **J. Crustacean Biol. 1:16-27.**

- 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.
- Florey, E.; Rathmayer, M. (1978). The effects of octopamine and other amines on the heart and on neuromuscular transmission in Decapod Crustaceans: Further evidence for a role as neurohormone. **Comp. Biochem. Physiol.** **61C:**229-237.
- Folch, J.; Lees, M.; Stanley, H.S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** **226:**497-503.
- Gilles, R. (1982). Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP** **6:**1-36.
- Gilles, R. (1983). Review: volume maintenance and regulation in animal cells some features and trends. **Molec. Physiol.** **4:** 3-16.
- Gilles, R. (1997). "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. **Comp. Biochem Physiol.**, **117A:** 279-290.
- Glowik, R. M.; Golowasch, J.; Keller, R.; Marder, E. (1997). D-Glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. **J. Experim. Biol.** **200:**1421-1431.
- Hanke, J.; Jaros, P.P.; Willig, A. (1993). Autoradiographic localization of opioid binding sites combined with immunogold detection of Leu-enkephalin. Crustacean

- hyperglycemic hormone and moult inhibiting hormone at the electron microscopic level in the sinus gland of the shore crab. *Carcinus maenas*. **Histochem.** **99(5)**:405-410.
- Hervant, F.; Mathieu, J.; Messana, G. (1997). Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. **C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/ Life sciences** **320**:139-148.
- Huberman, A.; Aguilar, M. B. (1986). A neurosecretory hyperglycemic hormone from the sinus gland of the mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Ortmann)-I. Purification and biochemical characterization of the most abundant form of the hormone. **Comp. Biochem. Physiol.** **85B (1)**:197-203.
- Hunkapiller, M. W.; Strickler, J. E.; Wilson, K. J. (1984). Contemporary methodology for protein structure determination. **Science** **226**:204-211.
- Jaros, P. P. (1990). Enkephalins, biologically active neuropeptides in invertebrates, with special reference to crustaceans. **Frontiers in Crustacean Neurobiology**:471-492.
- Johnston, M.A.; Davies, P.S. (1972). Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.** **41B**:433-443.
- Kegel. G.; Richwein. B.; Weese. S.; Gaus. G.; Peter-Katalinic. J.; Keller. R. (1989). Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. **FEBS Lett.** **255**:10-14.
- Keller. R. (1988). Radioimmunoassays and ELISAS: peptides. In Gilbert LI. Miller. TA (eds.): 'Immunological techniques: arthropods'. **Springerseries in Exp. Entomol.**

Heidelberg/New York: Springer. 253-272.

Keller, R. (1992). Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. **Experientia** **48**:439-448.

Keller, R.; Andrew, E.M. (1973). The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone. **Gen.Comp.Endocr.** **20**:572-578.

Keller, R.; Beyer, J. (1968). Zur hyperglykämischen Wirkung von Serotonin und Augenschieferextrakt beim Flusskrebs *Orconectes limosus*. **Z. vergl. Physiol.** **59**:78-85.

Keller, R.; Haylet, B.; Cooke. (1994). Neurosecretion of crustacean hyperglycemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline K⁺ concentration quantified by a sensitive immunoassay method. **J. Exp. Biol.** **188** (0):293-316.

Keller, R.; Orth, H. P. (1990). Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. **Progress Comp. Endocrinol.** 265-271 Wiley-Liss, Inc.

Keller, R.; Sedlmeier, D. (1988). A metabolic hormone in Crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In Laufer H., Downer, R.G.H. (eds): "Endocrinology of selected invertebrates. **Vol. 2 of Invertebrate Endocrinology**," New York: Alan R. Liss, pp 315-326.

Kucharski, L.C.R.; Capp, E.; Chittó, A.L.F.; Trapp, M.; Da Silva, R.S.M. and Marques, M. (1998). Insulin Signalling: Tyrosine Kinase Activity in the Crab *Chasmagnathus granulata* Gills. **J. Exp. Zool.** **282**

Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. (1991a). Seasonal variation on the energy metabolism

- in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.** **100A (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:**215-218.
- Kummer, G. e Keller, R.(1993). High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranas of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. **Peptides**, **14:**103-108.
- Lallier, F.H.; Walsh, P.J. (1991). Metabolic potential in tissue of blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bul Marine Science**, **48 (3):** 665-669.
- Loret, S.; Van Der Goor, N.; Devos, P. (1989). Suspensions d'Hemocytes et d'Hépatopancréatocytes pour L'étude, *IN VITRO*, de la charge en Glucose chez um Crustacé Décapodé. **Océanis**, **v.15(4):**419-431.
- Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Fau, A. L. and Randal, R. S. (1951). Protein measurements with the folin fenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **193:** 265-275.
- Lozada, M.; Romano, A.; Maldonado, H. (1990). Long-term habituation to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus*. **Physiol, & Behavior** **47:**35-41.
- Lüschen, W.; Willig, A.; Jaros, P. (1993) The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas*. **Comp. Biochem. Physiol.** **105:**291-296.

- Machado, C. R.; Garofalo, M. A. R.; Roselino, J. E. S.; Kettelhut, I. C.; Migliorini, R. H. (1988). Effects of starvation, refeeding, and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. **Gen. Comp. Endocrinol.** 71:429-437.
- Maldonado, H.; Romano, A.; Lozada, M. (1989). Opioid action on response level to a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus granulatus* . **Behavior Neuroscience** 103(5):1139-1143.
- Mañe-Garzon, F.; Dei-Cas, E.; Spector, B.H.; Leymonte, J. (1974). Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. **Physis, Seccion A** 33 (86):163-171.
- Mantel, L. H. (1985). Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. **Am. Zool.** 25:253-263.
- Mantel, L.; Farmer, L. L. (1983). Osmotic and ionic regulation in: Bliss, E.; Mantel, L. H.; The biology of crustacea. V.S., **Academic Press, London**, p.53-161.
- Martin, G. (1978). Action de la sérotonine sur la glycémie et sur la libération des neurosécrétions contenues dans la glande du sinus de *Porcellio dilatatus* Brandt (Crustacé, Isopode, Oniscoide). **C. R. Soc. Biol.** 172:304-307.
- Moreno, J.A. (1961). **Clima do Rio Grande do Sul**. Publicação da Secretaria de Agricultura do Estado do RGS. Diretoria de terras e colonização, seção de geografia. Porto Alegre.
- Morris S.; Airriess, C.N. (1998). Integration of physiological responses of crustaceans to

- environmental challenge. **S. Afr. J. Zool.** **33**:87-106.
- Morris, S.; Edwards, T. (1995). Control of osmoregulation via regulation of (Na⁺, K⁺)-ATPase activity in the amphibious purple shore crab *Leptograpsus variegatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** **112C (2)**:129-136.
- Nery, L.E.M. (1990) **Efeito da salinidade no metabolismo de carboidratos de *Chasmagnathus granulata* DANA, 1851 (Crustácea - Decapoda)**. Rio Grande: FURG, 1990. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Nery, L.M. (1999). **Regulação endócrina e sinalização intracelular da mudança de cor fisiológica do camarão de água-doce *Macrobrachium potiuna* (Crustacea-Decapoda)** Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Nery, L. E. M.; Santos, E. A.; Bianchini, A.; Gonçalves, A. A. (1993). Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** **26**:1291-1296.
- Nery, L.E.M; Santos, E.A. (1993) Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (crustacea, decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** **106B (3)**:747-753.
- Newgard, C. B.; Moore, S. V.; Foster, D. W.; McGarry, J. D. (1984). Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. **J. Biol. Chemistry** **259 (11)**:6958-6963.

O'Connor, J. D.; Gilbert, L. I. (1968). Aspects of lipid metabolism in crustaceans. **Am. Zoologist** **8**: 529-539.

Oliveira, G.T.(1993). **Estudo *in vitro* da gliconeogênese no hepatopâncreas do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae)**. Porto Alegre: UFRGS, 1993. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Oliveira, G.T. (1998). **Metabolismo de carboidratos em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos a diferentes períodos de anoxia ambiental e de recuperação**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Oliveira, G.T.; Da Silva, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, **118A (4)**:1429-1435.

Oliveira, G.T.; Da Silva, R.S.M. (1999). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, **in press**.

Pantin, C. F. A. (1948). Notes on microscopical techniques for zoologist. **Cambridge University Press, Cambridge**.

Passano, L.M. (1951). The X organ –sinus gland neurosecretory system in crabs. **Anat.**

Rec. 111: 502. (Abstr.).

Pierce, S. K. Jr. (1971). A source of solute for volume regulation in marine mussels. **Comp.**

Biochem. Physiol., **38 A:** 619-635.

Pillet, S. C.; Henry, R. P.; Doeller J. E.; Krauss, D.W. (1995). A comparison of the gill physiology of two euryaline crabs species, *C. sapidus*, *C. similis*: energy production transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. **J.**

Exp. Zool. **198:** 249-259.

Rathbum, M.J. (1918). The grapsoid crabs of America. **Smithsonian Institution, Bull. U.**

S. Nat. Mus. **97:**97-445.

Robertson, J.D.; Cowey, C.B.; Leaf, G. (1992). The free amino acids in muscle of three marine invertebrates *Nephrops norvegicus* (L), *Limulus polyphemus* (L) and *Eledone cirrhosa* (Lamarck). **Comp. Biochem. Physiol.**, **101 A (3):**545-548.

Romano, A.; Lozada, M. Maldonado, H. (1990). Effect of Naloxane pretreatment on habituation in the crab *Chasmagnathus granulata*. **Behavioral and Neural Biol.** **53:**113-122.

Romano, A.; Lozada, M. Maldonado, H. (1991). Nonhabituation processes affect stimulus specificity of response habituation in the crab *Chasmagnathus granulata*. **Behavioral Neuroscience** **105(4):**542-552.

Rothe, H.; Lüschen, W.; Asken, A.; Willig, A.; Jaros, P. (1991) Purified crustacean enkephalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab, *Carcinus maenas*.

- Comp. Biochem. Physiol.**99:57-62.
- Santos, E.A.; Baldisseroto, B.; Bianchini, A.; Colares, E.P.; Nery, L.E.M. e 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.; Colares, E.P. (1986) Blood glucose regulation in na intertidal crab *Chasmagnathus granulata* (Dana. 1851). **Comp. Biochem. Physiol.** **83A (4):**673-675.
- Santos, E.A.; Keller, R. (1993a). Effect of exposition to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). **Comp. Biochem. Physiol.**, **106 A (2):**343-347.
- Santos, E.A.; Keller, R. (1993b). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: current perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.**, **106A (3):**405-411.
- Santos, E.A.; Keller, R. (1993c). Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone-evidence for a dual feedback control sistem. **J. Comp. Physiol.** **163:**374-379.
- Santos, E.A.; Nery, L.E.M. (1987). Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.**, **87A (4):**1033-1035.
- Santos, E.A.; Nery, L.E.M.; Manzoni, G.C. (1988). Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). **Comp.**

Biochem. Physiol. 89A (3):329-332.

Santos. E.A.; Stefanello. T.M. (1991). The hemolymph of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda. Grapsidae) as a target tissue of the crustacean hyperglycemic hormone. **Braz. J. of Med. & Biol. Res. 24(3):267-270.**

Sarojini, R.; Nagabhushanam, R.; FIngerman, M. (1995) Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. **Gen. Comp. Endocrinol.97:160-170.**

Schein, V. (1999). **Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851.** Porto Alegre: UFRGS, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Schoeffeniel, E. (1976). Adaptations with respect to salinity. **Bioch. Soc. Sympo. 41: 179-204.**

Sedlmeier, D. (1987). The role of hepatopancreatic glycogen in the action of crustacean hyperglycemic hormone (CHH). **Comp. Biochem. Physiol., 87 A:423-425.**

Sedlmeier, D.; Keller, r. (1981). The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. **Gen. Comp. Endocrinol. 45:82-90.**

Sefiani. M.; Le Caer, J.P.; Soyez. D. (1996). Characterization of hyperglycemic and molt-

- inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Penaeus vannamei*. **Gen. Comp. Physiol.** , **103(1)**:41-53.
- Shulman, G. I.; Landau, B. R. (1992). Pathways of glycogen repletion. **Physiol. Reviews** **72 (4)**:1019-1035.
- Smullen, R.P.; David, J. A.; Pitman, R.M. (1996). Endocrine regulation of the Phosphatidylinositol pathway in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* and the shore crab *Carcinus maenas*. **Gen. Comp. Endocrinol** **104**:84-91.
- Sommer, M. J.; Mantel, L. H. (1988). Effect of dopamine, cyclic AMP, and pericardial organs on sodium uptake and Na/K-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* L. **Journal of Experimental Zoology**, **284**:272-277.
- Sommer, M. J.; Mantel, L. H. (1991). Effects of dopamine and acclimation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab *Carcinus maenas* (L). **Gen. Comp. Endocrinol.** **82**:364-368.
- Soyez. D. (1997). Occurrence and diversity of neuropeptides from the crustacean hyperglycemic hormone family in arthropods. A short review. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** **Apr24;814**:319-23.
- Strolenberg, G. E. C.; Van Herp, F. (1977). Mise en évidence du phénomène d'exocytose dans la glande du sinus d'*Astacus leptodactylus* (Nordmann) sous l'influence d'injections de sérotonine. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, Paris **284D**:57-59
- Sugden, M. C.; Holness, M. J.; Palmer, N. T. (1989). Fuel selection and carbon flux during

- the starved-to-fed transition. **Biochem. J.** **263**:313-323.
- Tan, C. H. and Choong, K.Y. (1981). Effect of hyperosmotic stress on hemolymph protein, muscle nihydrin-positive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Comp. Biochem. Physiol.**, **70 A**:485-489.
- Thabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, **40B**: 531-541.
- Thomas, J.A.; Schlender, K.K.; Lerner, J. (1968). A rapid filter paper assay for UDP glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. **Anal. Biochem.**, **25**:486-499.
- Trausch, G.; Forget, M.; Devos, P. (1989). Bioamines-stimulated phosphorylation and (Na⁺, K⁺)-ATPase in the gills of the chinese crab, *Eriocheir sinensis*. . **Comp. Biochem. Physiol.** **94B (3)**:487-492.
- Turcato, G.S. (1990). **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 1990. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas-Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.**
- Valeggia, C.; Fernandez-Duque, E.; Maldonado, H. (1989). Danger stimulus-induced analgesia in the crab *Chasmagnathus granulata*. **Brain research** **481**:304-308.
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt. Biochem.**, **11**:256-265.

- Vinagre, A. S. (1992). **Efeito da adaptação prévia a uma dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao jejum do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Porto Alegre: UFRGS, 1992. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Vinagre, A.S.; Capp, E. e Da Silva, R.S.M. (1998). Ação do hormônio hiperglicêmico (CHH) sobre a glicemia de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com as dietas rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP). (1998). **Livro de Resumos da XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Realizada em Caxambu, MG, 26 a 29 de agosto.
- Vinagre, A.S. and 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.**, **102** (3):579-583.
- Webster, S.G. (1993). High-affinity binding of putative moult-inhibition hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenas*. **Proc. Royal. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.** **251**:53-59.
- Webster, S. G. (1996). Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. **J. Experim. Biol.** **199**: 1579-1585.
- Wood, D. E. (1995). Neuromodulation of rhythmic motor patterns in the blue crab *Callinectes sapidus*, by amines and peptide proctolin. **J. Comp. Physiol. A.** **177**:335-

349.

Wood, D. E.; Derby, C. D. (1995). Coordination and neuromuscular control of rhythmic behaviors in the blue crab *Callinectes sapidus*. **J. Comp. Physiol. A.** 177:307-319.

Wood, D. E.; Glesson, R. A.; Derby, C. D. (1995). Modulation of behavior by biogenic amines and peptides in the blue crab *Callinectes sapidus*. **J. Comp. Physiol. A.** 177:321-333.

Wool, I. G.; Kral, M. E. (1959). Incorporation of C¹⁴ amino acids into protein of isolated diaphragms: role of the adrenal steroids. **Am. J. Physiol.** 196:961.

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

Zatta, P. (1987). Dopamine, noradrenaline and serotonin during hypo-osmotic stress of *Carcinus maenas*. *Marine Biology*, 96:479-481.