

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

**EFEITOS DO ESTRESSE HIPO E HIPEROSMÓTICO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS DO RECEPTOR À INSULINA E SOBRE A CAPTAÇÃO DE
GLICOSE EM BRÂNQUIAS DO CARANGUEJO *Chasmagnathus granulata***

Márcia Trapp

Porto Alegre, Agosto de 2005

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

**EFEITOS DO ESTRESSE HIPO E HIPEROSMÓTICO SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS DO RECEPTOR À INSULINA E SOBRE A CAPTAÇÃO DE
GLICOSE EM BRÂNQUIAS DO CARANGUEJO *Chasmagnathus granulata***

Márcia Trapp

Orientadora

Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientador

Dr. Luiz Carlos Kucharski

**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 (a) em Ciências.**

Porto Alegre, Agosto de 2005

***Aos meus pais Celso e Elena pelo
incentivo e amor***

“Nós não poderemos entender uma função se não entendermos a história de sua origem”

L.A. Orbeli

“O exemplo é uma força que repercute, de maneira imediata longe ou perto de nós... Não podemos nos responsabilizar pelo que os outros fazem de suas vidas; cada qual é livre para fazer o que quer de si mesmo, mas não podemos negar que nossas atitudes inspiram atitudes, seja no bem ou no mal...”

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Roselis Silveira Martins da Silva meu especial agradecimento pela orientação recebida, pela paciência e dedicação e pela amizade. Os seus exemplos profissionais e pessoais são fonte inspiradora de crescimento para aqueles quem convive.

Ao Dr. Luiz Carlos Kucharski que em todos esses anos de convivência sempre mostrou-se profissional e pessoalmente admirável. Obrigado pela paciência, estímulo e amizade. Com a certeza de que “...*dias piores virão...*” mas que nunca devemos perder o bom humor por isso.

Aos meus pais, Celso e Elena, sem os quais nada disso seria possível. Obrigado pelo incentivo, auxílio e carinho que sempre me deram, mas principalmente pelos exemplos de coragem, perseverança e amor que norteiam minhas atitudes.

À minha irmã Janina pelo suporte intelectual, técnico, fiosioterapêutico e principalmente psicológico durante as várias etapas deste trabalho.

Ao meu irmão Émerson e ao meu cunhado Pedro, pelos auxílios, paciência e compreensão durante as várias fases de realização desse trabalho.

A todos os meus familiares por sua compreensão, carinho e fé

Ao Alan Pöppl que como bolsista acompanhou toda a realização desta Tese - obrigado pela dedicação e amizade.

À Maria Alice Machado (tia Alice) pela manutenção técnica no início dessa Tese, pelo carinho e amizade.

Ao amigo Humberto Martins pela amizade e convivência saudosas.

Ao amigo Yann Waché, pelos inúmeros experimentos que dividimos no início deste trabalho, pela amizade e carinho.

Às amigas Vanessa Schein, Ana Lúcia Chittó, Alessandra Marqueze por sua convivência nesses anos de caminhada, pelos auxílios inúmeros e pelo companheirismo. Agradeço pela amizade sincera.

Aos demais colegas do laboratório, pela amizade.

À Rita pela importante manutenção do material radioativo.

Ao professor Édison Capp pelo importante auxílio em várias etapas desta Tese.

À Profa. Dra. Maria Flávia Ribeiro pela inestimável ajuda nos experimentos de *binding*.

Às Profas Dr. Poli Mara Spritzer e Dr Ilma S. Brum da Silva por possibilitarem a realização dos experimentos de Biologia Molecular e a todos os colegas deste Laboratório pelo auxílio, paciência e boa vontade.

Aos professores Dr. Pascal Fravel e Dr. Alan van Wormhoudt por possibilitarem a realização dos experimentos de Biologia Molecular, pelo suporte técnico e financeiro.

Ao curso de Pós-graduação em Fisiologia e a todos os colegas, professores, funcionários e amigos por tornarem possível a realização desta Tese.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro.

Ao caranguejo *Chasmagnathus granulata* que, mesmo sem consciência, foi o principal ator desta Tese, meu especial agradecimento.

SUMÁRIO

<i>RESUMO</i>	8
<i>INTRODUÇÃO</i>	12
<i>OBJETIVOS</i>	42
1. OBJETIVO GERAL	43
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
<i>MATERIAL E MÉTODOS</i>	44
1. Material	45
2. Animais	46
3. Manutenção dos animais	47
4. Estresse osmótico <i>in vivo</i>	47
5. Procedimentos experimentais	48
6. Preparação das membranas plasmáticas do tecido branquial	48
7. Dosagem de proteínas	49
8. Ensaios da ligação da ¹²⁵ I-insulina em presença de diferentes concentrações de insulina bovina.....	49
9. Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1)	52
10. Captação de [¹⁴ C] 2-deoxi-D-glucose.....	53
11. Extração do RNA total.....	54
12. Clonagem parcial do cDNA do receptor semelhante à insulina de crustáceo (CGIRLTK).....	54
13. Análise estatística.....	55
<i>TRABALHOS DESENVOLVIDOS</i>	57
CAPÍTULO 1	58
Characterization of insulin receptors in gills from crabs submitted to hyperosmotic stress.....	58
CAPÍTULO 2.....	79
Effect of hypo-osmotic condition on insulin receptor characteristics on the posterior gills of the crab <i>Chasmagnathus granulata</i>	79
CAPÍTULO 3.....	106
Effect of hypo- and hyperosmotic stress on insulin receptor from anterior gills of <i>Chasmagnathus granulata</i> crabs	106
<i>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS</i>	136
<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	142
<i>LISTA DE TRABALHOS</i>	155
1. Trabalhos submetidos para publicação	156
2. Trabalhos apresentados em congressos	156

RESUMO

Neste trabalho investigou-se as características do receptor à insulina e a capacidade de captação de glicose nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* aclimatado a diferentes tempos (24, 72 e 144 horas) de estresse hiper e hiposmótico.

Primeiramente, o cDNA do receptor para insulina foi parcialmente clonado e seqüenciado em brânquias posteriores de *Chasmagnathus granulata*. A seqüência peptídica mostrou a presença de 39 aminoácidos e foi designada CGIRLTK (*C. granulata* insulina receptor-like tyrosine kinase). Esta seqüência apresentou significativa homologia com o domínio tirosina quinase da subunidade β dos receptores para insulina de mamíferos (69%) e de *Drosophila* (74%).

Sítios de ligação à insulina foram caracterizados nas membranas plasmáticas das brânquias através do estudo de ligação com ^{125}I -insulina. A atividade tirosina quinase foi determinada pela capacidade do CGIRLTK de fosforilar o substrato sintético poly (Glu; Tyr 4:1). A captação de glicose foi avaliada pela captação de [^{14}C] 2-deoxi-D-glicose pelo tecido branquial.

Nas brânquias posteriores a insulina bovina estimulou significativamente a fosforilação do CGIRLTK nos animais aclimatados a 20‰ de salinidade (controle), já nas brânquias anteriores este estímulo não foi observado.

O estresse hiperosmótico (34 ‰ de salinidade) levou a uma diminuição do número e da afinidade dos receptores à insulina nas brânquias posteriores, bem como a uma redução na atividade tirosina quinase. A captação de glicose não mudou durante os tempos de estresse osmótico estudados. Esses resultados

mostram que o estresse hiperosmótico modifica a sinalização da insulina, causando um estado de resistência à insulina nas brânquias posteriores.

Nenhuma mudança foi observada na concentração dos receptores à insulina nas brânquias posteriores de caranguejos aclimatados durante 24 horas ao estresse hiposmótico (0‰). Contudo, foi observada uma redução na afinidade dos receptores pela insulina bovina. A fosforilação do CGIRLTK diminuiu às 24 horas de estresse e retornou aos valores basais às 144 horas. A captação de glicose não foi alterada significativamente. Os resultados sugerem que o estresse hiposmótico modifica as características do CGIRLTK nas brânquias posteriores de *C. granulata* de forma tempo-dependente. Essas mudanças são parte dos ajustes necessários à sobrevivência à baixa salinidade.

Nas brânquias anteriores, durante aclimação ao estresse hiperosmótico, foi observada redução da concentração e da capacidade de fosforilação dos receptores insulínicos. Contudo, a insulina bovina não estimulou a fosforilação nas brânquias anteriores durante o estresse.

Nenhuma alteração foi observada na concentração e na afinidade de receptores à insulina nas brânquias anteriores após 24 horas de estresse hiposmótico. A fosforilação do receptor à insulina diminuiu após 24 horas de estresse e voltou aos valores basais após 72 horas. A capacidade de captação de glicose, por sua vez, não foi modificada em função de mudanças na osmoliridade do ambiente. Assim como no estresse hiperosmótico, a insulina bovina não estimulou a fosforilação nas brânquias anteriores no estresse hiposmótico.

Os resultados deste trabalho demonstram que o estresse osmótico modifica as características do CGIRLTK e conseqüentemente a transdução do sinal

insulínico nas brânquias. As respostas às alterações de salinidade dependem do tipo de estresse ao qual o animal é submetido e da brânquia estudada (anterior ou posterior). As mudanças observadas no sinal insulínico fazem parte dos ajustes necessários para a regulação osmótica frente às mudanças ambientais de salinidade.

Palavras chave: estresse osmótico, crustáceos, receptor de insulina, clonagem, brânquias anteriores, brânquias posteriores, tirosina quinase.

INTRODUÇÃO

A insulina foi descoberta em 1922 em mamíferos e posteriormente foi comprovado que este hormônio tem uma ampla distribuição filogenética e atua sobre a homeostase de diversos processos fisiológicos tanto em vertebrados quanto em invertebrados (CHAN e STEINER, 2000).

Na década de 1970 a insulina foi isolada e seqüenciada em todas as classes de vertebrados e os estudos comparativos realizados dos agnata aos mamíferos demonstraram que o hormônio e suas funções sofreram poucas modificações ao longo da evolução. Além disso, foi descoberto que os genes da superfamília da insulina em vertebrados incluíam dois hormônios peptídicos funcional e estruturalmente relacionados à insulina – (fatores de crescimento relacionados à insulina I e II– IGF I e II) (CZECH, 1985; CHAN e STEINER, 2000).

Quanto à estrutura, a insulina de mamífero é uma molécula que consiste de duas cadeias polipeptídicas (A e B), ligadas por bandas dissulfídicas. Essas cadeias são compostas por 51 aminoácidos, correspondendo 21 a cadeia A e 30 a cadeia B, sendo esta região responsável pela atividade biológica (DEVLIN, 2003).

A produção e secreção da insulina foram inicialmente atribuídas às células β -pancreáticas e posteriormente descobriu-se que vários neurônios de diferentes regiões do Sistema Nervoso de vertebrados e de invertebrados poderiam produzir insulina (LEROITH *et al.*, 1988; SMIT *et al.*, 1998).

Nas últimas décadas, substâncias semelhantes à insulina foram detectadas por métodos imunológicos, histoquímicos e de biologia molecular em uma grande variedade de invertebrados, tais como tunicados, insetos, crustáceos, moluscos,

nematódeos, protozoários ciliados, fungos (*Aspergillus* e *Neurospora*) e em procariotos como *Escherichia coli* (ULRICH, 1990). Contudo, poucas moléculas da superfamília da insulina foram até agora caracterizadas em invertebrados. Atualmente são conhecidas: as bombixinas (4K-PTTHs) do bicho-da-seda *Bombyx mori* (ISHIZAKI *et al.*, 1983); os peptídeos relacionados à bombixina na mariposa *Samia cynthia ricini* (KIMURA-KAWAKAMI *et al.*, 1992); duas isoformas de peptídeos relacionados à insulina –LIRP-T1 e T2 do gafanhoto *Locusta migratoria* (LAGUEUX *et al.*, 1990; KROMER-METZGER e LAGUEUX, 1994); sete isoformas de peptídeos semelhantes à insulina (MIPS de 1-7) do molusco *Lymnaea stagnalis* (SMIT *et al.*, 1998); peptídeo semelhante à insulina em *Aplysia californica* (FLOYD *et al.*, 1999); cinco potenciais peptídeos com significativa homologia às insulinas de camundongo e humana (DILPs 1-5) e dois (DILPs 6 e 7) com menores similaridades na mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (BROGIOLO *et al.*, 2001; VANDEN, 2001), e vários peptídeos relacionados à insulina no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (GREGOIRE *et al.*, 2000; KAWANO *et al.*, 2000).

Todas as substâncias *insulin-like* clonadas em invertebrados foram isoladas em células do Sistema Nervoso. O alinhamento das seqüências peptídicas mostrou que as moléculas semelhantes à insulina de invertebrados apresentam pouca homologia entre si e com as insulinas e IGFs de vertebrados. Entretanto, todas as moléculas apresentam cadeias peptídicas A e B, conservadas regiões ricas em cisteína e bandas dissulfídricas que são típicas para todos os membros da superfamília da insulina (CHAN e STEINER, 2000; CLAEYS *et al.*, 2002).

Atualmente, peptídeos da superfamília da insulina incluem não apenas a insulina e os fatores de crescimento relacionados (IGFs I e II), mas também as relaxinas e peptídios *insulin-like* de Leydig e os peptídios *insulin-like* de invertebrados. (CHAN e STEINER, 2000; CLAEYS *et al.*, 2002; PERTSEVA e SHPAKOV, 2002). Esses peptídios são considerados da mesma família com base nas características estruturais básicas e em sua estrutura terciária.

A ampla distribuição filogenética das moléculas da família da insulina suscitou investigações a respeito da origem evolutiva deste hormônio. CHAN e STEINER (2000) sugeriram que a insulina e os fatores de crescimento relacionados evoluíram a partir de um gene ancestral comum. De acordo com o conceito moderno, acredita-se que esse gene apareceu na escala evolutiva a aproximadamente 600 milhões de anos, em representantes dos Archaemetazoa (precursores dos vertebrados e invertebrados) (PERTSEVA e SHPAKOV, 2002). CHAN e STEINER (2000) propuseram que a molécula *insulin-like* ancestral funcionou primariamente como um fator de crescimento mitogênico, mas em vertebrados, o gene da insulina teria evoluído para tornar-se um hormônio chave na regulação do metabolismo intermediário.

Em vertebrados, o evento inicial da ação pleotrópica da insulina é a ligação do hormônio a receptores localizados na membrana plasmática de células-alvo. Estes receptores reconhecem a insulina e com ela interagem com alto grau de seletividade e afinidade, transmitindo o sinal intracelular que resulta na resposta biológica do hormônio (CHEATHAM e KANH, 1995; SALTIEL e KANH, 2001).

CZECH (1985) relatou que o receptor para insulina em todas as espécies de vertebrados estudadas, desde o primitivo peixe bruxa, é uma molécula heterotetrâmera, com duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembrana. Segundo SALTIEL e KANH (2001), essas subunidades funcionam como enzimas alostéricas, nas quais a subunidade α inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade β .

A ligação da insulina à subunidade α leva à liberação da atividade quinase na subunidade β , seguida por transfosforilação desta subunidade e mudanças conformacionais que iniciam uma complexa cascata de fosforilações em sítios de tirosina nesta subunidade. Essa cascata envolve 6 a 7 resíduos de tirosina, sendo três resíduos da subunidade β (Tyr1158, Tyr1162 e Tyr1163) os principais sítios de autofosforilação responsáveis pelo grau de ativação da tirosina quinase. Além da fosforilação da subunidade β do receptor, a transdução do sinal pela insulina ocorre através de eventos pós-receptor com a fosforilação de proteínas citoplasmáticas (*docking proteins*), como as proteínas da família do substrato do receptor para insulina (IRS 1 - 4), o fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-K) ou as proteínas da via das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAP quinase) (CHEATHAM e KANH, 1995; SALTIEL e KANH, 2001).

Em invertebrados, assim como em vertebrados, os receptores das substâncias semelhantes à insulina e os IGFs (fatores de crescimento) pertencem à família dos receptores com atividade tirosina quinase (RTKs) (YAMAGUCHI *et al.*, 1995; KUCHARSKI *et al.*, 1999). Os trabalhos da literatura demonstram que a transdução da informação desses hormônios sofreu poucas modificações ao longo

da evolução. Parece que os processos desencadeados pela interação hormônio-receptor são os mesmos dos invertebrados aos mamíferos, apesar da diferença na seqüência de aminoácidos desses receptores (MUGGEO *et al.*, 1979; YAMAGUCHI *et al.*, 1995; SALTIEL e KANH, 2001).

Várias moléculas da família do receptor à insulina foram caracterizadas em diversas classes de invertebrados, tais como: insetos - *Drosophila melanogaster* (FERNANDEZ-ALMONACID e ROSEN, 1987; NISHIDA *et al.*, 1986; PETRUZZELLI *et al.*, 1986), *Bombyx mori* (FULLBRIGHT *et al.*, 1997), *Aedes aegypti* (GRAF *et al.*, 1997); em moluscos gastrópodes e bivalves - *Lymnaea stagnalis* (ROOVERS *et al.*, 1995), *Aplysia californica* (JONAS *et al.*, 1996), *Biomphalaria glabrata* (LARDANS *et al.*, 2001), *Anodonta cygnea* (LEIBUSH e CHISTYAKOVA, 2003), *Crassostrea gigas* (GRICOURT *et al.*, 2003); no celenterado hidrozoário - *Hydra vulgaris* (STEELE *et al.*, 1996); nos vermes - *Caenorhabditis elegans* (KIMURA *et al.*, 1997) e *Echinococcus multilocularis* (KONRAD *et al.*, 2003); e em poríferos (SCHÄCKE *et al.*, 1994; SKOROKHOD *et al.*, 1999).

PETRUZZELLI *et al.* (1986) demonstraram que os receptores para mosca-da-fruta ou DIR (*Drosophila Insulin Receptor*) são estruturalmente semelhantes ao receptor de insulina humano, com 63% de homologia do domínio tirosina quinase. YAMAGUCHI *et al.* (1995) construíram receptores quiméricos contendo o domínio extracelular do receptor de insulina humano, com as regiões transmembrana e intracelular de mosca-da-fruta. Esses receptores foram expressos em células de mamíferos e apresentaram a mesma habilidade de mediar a atividade de fosforilação em tirosina do substrato 1 do receptor à insulina (IRS-1), de estimular

a proliferação celular e de ativar a MAP quinase quando comparados aos receptores de insulina humanos.

HELBLING e GRAF (1998) clonaram o homólogo do receptor de insulina de mosquito - MIR (*mosquito insulin receptor*). Os autores descreveram que os receptores para insulina são expressos principalmente nos ovários, provavelmente com função relacionada à reprodução nesses insetos.

ROOVERS *et al.* (1995) caracterizaram o receptor do molusco *Lymnaea stagnalis* – MIPR (*molluscan insulin-related peptide receptor*). Os autores demonstraram que esse receptor apresentou homologia de 69% no domínio tirosina quinase com o receptor de insulina humano e, apesar de existirem várias isoformas de peptídeos *insulin-like* (MIPs de 1 – 7) em *L. stagnalis*, foi encontrado apenas um tipo de receptor.

JONAS *et al.* (1996) isolaram o cDNA para a região tirosina quinase do receptor de insulina expresso no sistema nervoso do molusco *Aplysia californica*. Estudos de ligação e de imunocitoquímica mostraram que o receptor é muito abundante em um grupo de células neuronais (*bag cell neurons*) - responsáveis pelo surgimento do comportamento reprodutivo nesse molusco.

Esses receptores semelhantes à insulina de invertebrados apresentam homologia estrutural e funcional entre si e com os receptores de vertebrados. Entretanto, contrastando com as várias isoformas de moléculas *insulin-like* encontradas em invertebrados, exemplificadas pelos MIPs (1-7) e DIPs (1-7), todos os trabalhos até agora sugerem a presença de um único receptor para

diferentes isoformas do hormônio (CLAEYS *et al.*, 2002; GRICOURT *et al.*, 2003). Acredita-se que as várias moléculas semelhantes à insulina de invertebrados ligam-se em diferentes sítios de um mesmo receptor ou com diferentes afinidades para desencadear as respostas hormonais. Assim, os dados existentes até o momento com relação às substâncias *insulin-like* e seus receptores em invertebrados sugerem que os receptores são evolutivamente mais conservados do que o hormônio (MUGEO *et al.*, 1979; CLAEYS *et al.*, 2002).

A sinalização pós-receptor em invertebrados é ainda pouco conhecida quando comparada com os dados em mamíferos, sendo que substâncias intracelulares envolvidas nos eventos de transdução do sinal da insulina foram identificadas apenas em *D. melanogaster* e *C. elegans* (Fig.1). Em drosófila, foram caracterizadas várias substâncias homólogas às moléculas encontradas em mamíferos: substâncias homólogas ao IRS-I (CHICO), ao Grb2 (Drk), ao MEK (DSORT), ao ERK (ERK-A), a PI3K (Dp110). Contudo, os eventos de transdução do sinal podem envolver a ativação do CHICO ou a ligação de substratos, como o PI3K, no próprio receptor em locais específicos (*docking sites*). No nematóide *C. elegans* também foram identificadas moléculas semelhantes ao PI3K (AGE-1) a ao AKT-1 e AKT-2 (PKB) e, assim como em drosófila, os eventos sinalizadores podem se desenvolver sem o uso de moléculas IRS. Nesse nematóide, o caminho sinalizador da insulina, envolve a ativação de AGE-1 e regula o metabolismo, o desenvolvimento e a longevidade (CLAEYS *et al.*, 2002; PORTE Jr. *et al.*, 2005).

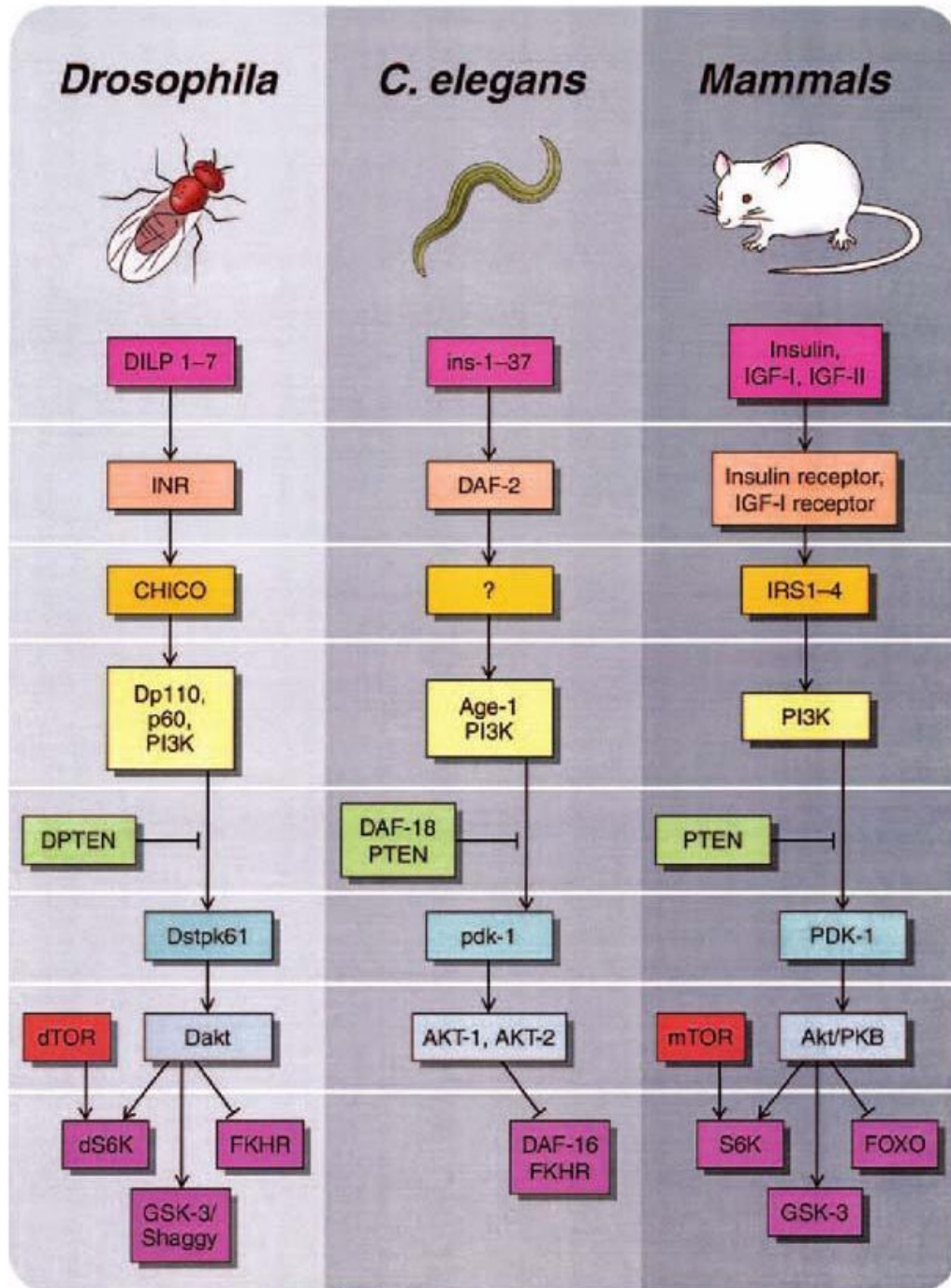


Figura 1. Substâncias intracelulares envolvidas com a transdução do sinal da insulina – comparação entre *D. melanogaster*, *C. elegans* e mamíferos (Figura retirada do trabalho Porte Jr *et al.*, 2005)

A ligação de moléculas da família da insulina aos seus receptores de membrana desencadeia cascatas de eventos intracelulares, com a ativação de várias proteínas e substratos citoplasmáticos, que culminam nas respostas biológicas ao hormônio. As funções das substâncias da família da insulina estão relacionadas com a regulação do metabolismo, do crescimento e diferenciação celulares; o controle da reprodução e da longevidade; a osmorregulação e o controle do volume celular (SALTIEL e KAHN, 2001; PORTE Jr. *et al.*, 2005).

A insulina e os fatores de crescimento relacionados à insulina (IGF- I e IGF-II) têm um importante papel na regulação do metabolismo e crescimento em mamíferos. A insulina age estimulando os processos endergônicos de síntese. Em adição a esse efeito, a insulina também é responsável por vários outros eventos celulares, incluindo: a regulação do transporte de íons, aminoácidos e glicose, a transcrição de genes e a modulação da transcrição de mRNAs específicos, além da síntese de DNA. Desta forma, a insulina é considerada o principal hormônio envolvido nos processos anabólicos e metabólicos nos vertebrados (WHITE e KAHN, 1994; NAVARRO *et al.*, 1999; SALTIEL e KAHN, 2001). Os IGF-I, por sua vez, estimulam o crescimento e a diferenciação normais dos tecidos. Ambos ligam-se especificamente aos seus receptores de superfície celular e as interações da insulina com seus receptores são semelhantes em mamíferos, pássaros, anfíbios e peixes ósseos (NAVARRO *et al.*, 1999).

Em vertebrados, a insulina aumenta o transporte de glicose em células musculares e adipócitos pela estimulação da translocação de transportadores de glicose sensíveis à insulina (GLUT-4) do meio intracelular para a membrana plasmática. Esses transportadores podem ser estimulados por fatores não

hormonais, como a contração muscular e o estresse osmótico (CHEN *et al.*, 1997; SALTIEL e KAHN, 2001; TOMÁS *et al.*, 2002;). Em invertebrados, WELCOMME e DEVOS (1994) identificaram imunologicamente a presença de proteínas transportadoras de glicose semelhantes ao GLUT4 (38KDa) nas brânquias de *Carcinus maenas* sugerindo que parte dos eventos de transdução do sinal insulínico estão conservados ao longo da evolução.

Evidências recentes e crescentes suportam a idéia de que o sistema sinalizador da insulina esteja envolvido com a regulação da reprodução em mamíferos. A restrição calórica em mamíferos está associada com a secreção reduzida da insulina e de hormônios reprodutivos, como FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (hormônio luteinizante) (PORTE Jr. *et al.*, 2005). Além disso, ratos transgênicos *knockout* para receptores insulínicos cerebrais apresentaram diminuição nas reservas de lipídio corporais e diminuição na capacidade reprodutiva, devido à diminuição na secreção de FSH e LH (BRUNING *et al.*, 2000).

As funções exatas da insulina em vertebrados não mamíferos, como os peixes, ainda estão sob investigação. A insulina é o hormônio mais relacionado à regulação metabólica da glicose, mas ela pode ter um papel secundário no crescimento e diferenciação celular em peixes, processo que, em mamíferos, é predominantemente regulado pelo IGF-I (PLANAS *et al.*, 2000).

PLISETSKAYA e DUAN (1994) injetando estreptozotocina (conhecida por danificar as células β -pancreáticas em mamíferos) em salmão verificaram uma diminuição na produção de insulina. Esta redução, por sua vez, causou diminuição

na expressão do IGF-I no fígado e, conseqüentemente, prejuízos ao crescimento normal desse animal. Assim demonstrando que a insulina pode afetar o crescimento em peixes.

Recentemente, foi demonstrado por MÉNDEZ *et al.* (2005) que a insulina e o IGF-I, provavelmente através da via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), bloqueiam a ação do hormônio luteinizante (LH) em ovários de truta, demonstrando que esses hormônios podem exercer funções importantes na regulação da reprodução em peixes.

Em invertebrados, as ações da insulina e dos IGFs se confundem ainda mais, sendo que ambos participam nos processos de diferenciação e crescimento celular em praticamente todos os grupos estudados (CHAN e STEINER, 2000). Além disso, acredita-se que as moléculas insulina/IGF estejam envolvidas com os processos de regulação do metabolismo, reprodução e ciclo de vida e com a osmorregulação. (YAMAGUCHI *et al.*, 1995; EPPLÉ e BRINN, 1987; JONAS *et al.*, 1996;. RICHARDSON *et al.*, 1997; BÖHNI *et al.*, 1999; RULIFSON *et al.*, 2002; KUCHARSKI *et al.*, 2002).

As concentrações de trealose (principal hexose da hemolinfa de insetos) são controlados por hormônios. STEEL (1961) mostrou que injeções de extrato de *corpora cardíaca* – CC (órgão estrutural e funcionalmente análogo à pituitária posterior de vertebrados) causava hipertrealosemia na barata *P. americana*. SATAKE *et al.* (1997) demonstraram que injeção de bombixina na larva de *B. mori* causava uma diminuição dose-dependente na concentração de trealose circulante. Em adição, a bombixina também diminuiu o conteúdo de glicogênio no

corpo gorduroso. Assim, o tratamento com bombixina modulou o metabolismo de carboidratos no bicho-da-seda.

Recentemente, RULIFSON *et al.* (2002) realizaram estudos com células produtoras de insulina (*insulin-producing cells* - IPCs) localizadas no sistema nervoso de *Drosophila melanogaster*, as quais produzem substâncias *insulin-like*. Os autores demonstraram que a ablação destas células em larvas resultou em aumento de 38% na concentração de carboidratos da hemolinfa, sugerindo que a insulina é um regulador essencial no metabolismo energético da mosca-da-fruta.

Vários estudos mostram também que há uma relação entre o sinal da insulina e a fisiologia reprodutiva de invertebrados. Bombixina foi originalmente detectada no cérebro, mas utilizando-se técnicas de biologia molecular, foi demonstrada a expressão de bombixina em outros órgãos, incluindo ovários. Além disso, significativo aumento de bombixina foi encontrado na hemolinfa de fêmeas de *B. mori* (IWAMI *et al.*, 1996). Mais recentemente, FULLBRIGHT *et al.* (1997) identificaram sítios de ligação específica para bombixina nas células de ovário de três diferentes espécies de lepidóptera. A hipótese de que os fatores *insulin-like* estão envolvidos no desenvolvimento das células ovarianas de várias espécies de lepidópteras pode levar a novas estratégias para o controle de pestes.

Em 1998, HELBLING e GRAF demonstraram que o receptor de insulina do mosquito *Aedes aegypti* (MIR) está localizado nas células foliculares que rodeiam os oócitos. Em fêmeas adultas, estas células são a fonte primária de ecdiesteróides, os quais regulam a produção de vitelogenina. Os autores sugerem

que a secreção de ecdisona está sob o controle de hormônios *insulin-like* e é mediada por esses receptores ovarianos. Em adição, a insulina bovina mostrou um efeito dose-dependente estimulatório na produção de ecdiesteróides no ovário de mosquito, assim como na síntese de proteína (GRAF *et al.*, 1997).

A completa transdução do sinal insulínico é necessária para que a mosca-da-fruta possa regular a produção de ovos em resposta a mudanças nutricionais e estimular a vitelogênese (DRUMMOND-BARBOSA e SPRADLING, 2001). Em mutantes de *D. melanogaster*, nos quais o CHICO (proteína semelhante ao IRS-I) foi deletado, as fêmeas tornaram-se estéreis e ocorreu aumento nos estoques de lipídio (BÖHNI *et al.*, 1999). Em adição, fêmeas mutantes, sem receptores *insulin-like*, apresentam ovários que estacionam seu desenvolvimento no estágio pré-vitelogênico e uma diminuição da produção de hormônio juvenil (TATAR *et al.*, 2001). Os dados sugerem que o sinal do receptor *insulin-like* em fêmeas de inseto está envolvido no controle do processo reprodutivo via regulação da biossíntese e liberação de hormônios juvenis e / ou ecdiesteróides.

Na lesma do mar *Aplysia californica*, a exposição à insulina por 15 a 30 minutos aumentou a amplitude e diminuiu a duração do potencial de ação de um grupo de células neuronais isoladas (*bag cell neurons*). Estes resultados sugerem que a substância similar à insulina de *A. californica* atue como um neuromodulador ou neurotransmissor, regulando a excitabilidade desses neurônios os quais estão envolvidos com o comportamento reprodutivo desse molusco (JONAS *et al.*, 1996).

Vários trabalhos demonstram o envolvimento das substâncias da família da insulina/IGF no crescimento e desenvolvimento em invertebrados. Na ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, o IGF-I humano estimulou a síntese de proteína em células do manto, sendo que a estimulação hormonal foi maior na primavera (período de maior crescimento desses animais) do que em outras estações. Receptores *insulin-like* foram caracterizados nestas células e estão relacionados com o crescimento da concha e dos tecidos moles. Nesses animais, como em mamíferos, o IGF-I foi mais eficiente do que a insulina em promover o crescimento corporal (GRICOURT *et al.*, 2003).

Em moscas-da-fruta que sofreram mutação para a proteína homóloga ao IRS-I (CHICO) foi observada redução do tamanho corporal, do número e tamanho das células em relação aos animais normais (BÖHNI *et al.*, 1999). RULIFSON *et al.* (2002) estudaram os efeitos da ablação das células neurais produtoras de substâncias *insulin-like* (IPCs) sobre o crescimento das larvas de mosca-da-fruta. Os autores descreveram que as larvas sem IPCs apresentaram uma redução de 42% do tamanho normal e as moscas adultas possuíam asas 61% menores do que aquelas do grupo controle. Além disso, o tempo de desenvolvimento das larvas até pupas passou de 5 dias (controle) para 12 (animais sem IPCs). Todos os dados em conjunto sugerem que a insulina e a transdução do sinal insulínico têm um papel importante no ciclo de vida em *D. melanogaster*, controlando a metamorfose, o número das células e o tamanho dos indivíduos.

Em mutantes de *Caenorhabditis elegans*, que produzem reduzidas quantidades de DAF-2 (homólogo do receptor à insulina) ou AGE-1 (homólogo da

PI3K), o tempo de vida total é mais longo. Também ocorre acúmulo de lipídios corporais e indução a um estado de diapausa reversível (*dauer stage*) nas larvas, demonstrando que a redução no sinal da insulina aumenta a longevidade nesses vermes (VANFLETEREN e BRAECKMANS, 1999; KIMURA *et al.*, 1997).

Outra função sugerida para moléculas da família da insulina/IGF seria o possível envolvimento na comunicação entre hospedeiros e parasitas. Estudos realizados em células embrionárias de *Biomphalaria glabrata*, que é hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, demonstraram a presença de receptores *insulin-like* com atividade tirosina quinase. A *insulin-like* poderia interferir na interação entre células de *B.glabrata* e os esporocistos do parasita (LARDANS *et al.*, 2001). Em *S. mansoni* também foi identificado um receptor tirosina quinase com características diferentes dos receptores à insulina, mas que pode estar envolvido no crescimento e diferenciação destes animais. Além disso, foi descrito que a insulina aumenta a atividade metabólica nesse verme (VICOONE *et al.*, 2003).

Foi identificado um receptor *insulin-like* em larvas de tênia *Echinococcus multilocularis* (parasita que causa equinocosis alveolar em humanos) que apresenta características semelhantes ao receptor de insulina de mamífero, com alta homologia na região tirosina quinase e na região de ligação ao hormônio (KONRAD *et al.*, 2003). Os autores sugerem que o receptor relacionado à insulina expresso nestes platelmintos permite a interação do sistema endócrino do hospedeiro com o do parasita, através da ligação do hormônio do hospedeiro nesses receptores *insulin-like* do parasita.

Embora nenhuma molécula *insulin-like* tenha sido ainda clonada em crustáceos, SANDERS (1983a) identificou e isolou por cromatografia uma molécula semelhante à insulina no hepatopâncreas da lagosta *Homarus americanus*. Essa molécula foi capaz de estimular a fosforilação de receptores à insulina de placenta humana. Recentemente, GALLARDO *et al.* (2003) isolaram e caracterizaram uma proteína *insulin-like*, também no hepatopâncreas da lagosta *Panulirus argus*. Essa proteína interagiu com anticorpos anti-insulina de mamíferos e estimulou a oxidação total de glicose a CO₂ e a lipogênese em adipócitos de rato isolados.

Quanto aos receptores *insulin-like*, CHUANG e WANG (1993) isolaram, do hepatopâncreas do camarão *Penaeus japonicus*, uma proteína fosfotirosil-fosfatase que defosforilou receptores à insulina de camarão e humanos. Posteriormente, os autores caracterizaram imunologicamente a subunidade β de 79KDa do receptor de insulina do músculo desse camarão. A insulina de mamífero estimulou a autofosforilação deste receptor em resíduos de tirosina e a proteína fosfotirosil-fosfatase de placenta humana causou sua defosforilação (CHUANG e WANG, 1994).

Pela técnica de radioreceptores, KUCHARSKI *et al.* (1997) demonstraram *in vivo* e *in vitro*, nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, a presença de sítios de ligação à insulina com propriedades semelhantes àquelas dos receptores de vertebrados. Em 1999, KUCHARSKI *et al.* avaliaram a atividade tirosina quinase em receptores isolados de brânquias, na presença e na ausência de insulina bovina. Os autores constataram que a insulina aumentou (1,3 vezes) a

capacidade de autofosforilação do receptor (subunidade de 95kDa), detectada por autorradiografia e pela fosforilação do substrato exógeno poly (Glu: Tyr 4:1). A genisteína que é um potente inibidor da atividade da tirosina quinase, bloqueou a estimulação da insulina.

EPPLE e BRINN (1987) sugeriram que a influência da insulina sobre o metabolismo de proteínas é filogeneticamente muito antiga e provavelmente envolve várias funções sobre o metabolismo intermediário, o crescimento, a diferenciação e a osmorregulação.

Com relação aos efeitos biológicos da insulina / IGF em crustáceos, os trabalhos de SANDERS (1983 a, b, c) demonstram que a insulina bovina aumentou, no músculo da lagosta *Homarus americanus*, a incorporação do ^{14}C da glicose em glicogênio. Contudo, a insulina endógena encontrada na hemolinfa desse crustáceo não apresentou efeito glicostático. Após, outros autores demonstraram que a insulina de mamífero aumentou a captação de glicose nas brânquias posteriores do caranguejo *Carcinus maenas* (WELCOMME e DEVOS, 1994) e no músculo da craca *Balanus balanus* (HAGER e BITTAR, 1985). Em *Cherax quadricarinatus*, a insulina humana e o IGF-I aumentaram a concentração de glicose livre no hepatopâncreas e no músculo. Além disso, o IGF-I estimulou a incorporação de ^{14}C da glicose em glicogênio no músculo e o ^{14}C da leucina em proteínas no hepatopâncreas e no músculo, sugerindo um duplo efeito para esse hormônio em crustáceos (RICHARDSON *et al.*, 1997).

Em 2002, KUCHARSKI *et al.* verificaram que a insulina bovina aumentou a incorporação do ^{14}C -glicose em glicogênio e a captação de glicose em brânquias posteriores, contudo o efeito não foi observado em brânquias anteriores. A magnitude da estimulação foi influenciada pela variação sazonal, sendo que no verão a dose necessária para promover esse aumento foi de $40\mu\text{U/ml}$ e no inverno foi de $20\mu\text{U/ml}$.

MARTINS (2003) demonstrou que o tratamento do caranguejo *C. granulata* com insulina porcina por 8 dias não causou variação nos níveis de glicose da hemolinfa, o que sugere que este hormônio não tem efeito glicostático em crustáceos. Contudo, a insulina de mamífero aumentou a captação de aminoácidos (ácido amino butírico – AIB) nas brânquias posteriores e no hepatopâncreas e a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase nas brânquias posteriores.

TRAPP (2000) demonstrou que a composição da dieta e o estado alimentar influenciam a capacidade de fosforilação do receptor *insulin-like* do tecido branquial do caranguejo *Chasmagnathus granulata*. A administração de dieta rica em carboidratos (RC) aumentou a fosforilação basal do receptor insulínico, detectada pela fosforilação do substrato exógeno poly (Glu: Tyr) 4:1, em relação à dieta rica em proteína (RP). Além disso, foi evidenciando um aumento na fosforilação do receptor após 30 dias de jejum em animais previamente alimentados com dieta RP. A insulina bovina estimulou a capacidade de fosforilação do receptor nos animais RP e a autofosforilação do receptor para insulina (subunidade de 95kDa) de forma idêntica nos animais RP e RC. Os dados

sugerem que a insulina participa no processo de regulação metabólica do tecido branquial de crustáceo quando submetido a diferentes dietas e ao jejum.

O estudo do papel da insulina na osmorregulação tem se intensificado em mamíferos, porém os dados da literatura são bastante controversos.

Estudos realizados com hepatócitos de mamíferos mostram alguns efeitos da variação da concentração do meio extracelular sobre o volume celular. Células subitamente submetidas ao meio hiposmótico incham e, dentro de minutos, retornaram parcialmente ao seu volume original. Esse comportamento foi denominado redução do volume celular regulatório (*regulatory cell volume decrease* - RVD). Inversamente, a exposição súbita ao meio hiperosmótico leva a uma redução do volume celular e, após poucos minutos, ocorre aumento regulatório do volume (*volume regulatory increase* – RVI), retornando o volume aos níveis iniciais. Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou RVI podem diferir entre diferentes tipos celulares, mas em geral envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons e solutos orgânicos na membrana plasmática (HÄUSSINGER *et al.*, 1994).

Mudanças de volume celular modificam várias funções metabólicas. O aumento de volume celular favorece a síntese e inibe a degradação de proteínas, glicogênio e, em menor extensão, lipídios. A diminuição de volume celular tem efeito oposto. Assim, o aumento de tamanho celular causado pelo estresse hiposmótico pode ser considerado como um sinal anabólico, enquanto que a redução de volume favorece o catabolismo (LANG *et al.*, 1998).

Nos hepatócitos, a influência sobre o volume celular é um dos caminhos pelos quais a insulina exerce seus efeitos metabólicos. A insulina aumenta o volume celular das células do fígado pela ativação dos transportadores Na^+/H^+ , $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ e $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. Assim aciona uma variedade de funções metabólicas, incluindo a síntese de proteínas, glicogênio e lipídios e inibição da degradação de glicogênio e proteínas (LANG *et al.*, 1998)

Por seus efeitos anabólicos, suspeita-se que a insulina possa estar envolvida nos processos de RVI, mas ainda não está claro em qual extensão. Os dados a respeito dos efeitos da insulina sobre o processo de osmorregulação ou vice-versa ainda são controversos. (HÄUSSINGER *et al.*, 1994).

Tanto a insulina como o choque hiposmótico causam um aumento do volume celular. Em mamíferos, existem várias proteínas que são ativadas por ambos insulina e estresse hiposmótico, como PI3-K, MAPquinases e Jun-NH2-terminal kinase (JNK) ou quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK-1 e 2) (LANG *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2001; CHIRI *et al.*, 2004). Nas brânquias do teleosteo eurialino *Fundulus heteroclitus* ocorre aumento da atividade de várias MAPquinases em resposta ao choque hiposmótico. Esse aumento inicia a 1 hora de estresse e é sustentado por 4 semanas (KÜLTZ e AVILA, 2001). Em células A6 epiteliais renais de anfíbio, o choque hiposmótico ativa o ERK dentro de minutos (CHIRI *et al.*, 2004). Contudo, estudos relacionando mudanças causadas pelo estresse hiposmótico e sinal da insulina em vertebrados e invertebrados são inexistentes.

O choque hiperosmótico parece modular a ação da insulina em vertebrados de uma forma tecido-específica. Estresse hiperosmótico causa aumento do

estímulo da insulina em alguns tipos de células de mamíferos, como músculo esquelético e células de ovário (OUWENS *et al.*, 2001; GUAL *et al.*, 2003a) e causa fosforilação do IRS-1 em resíduos de serina, o que leva à resistência à insulina em adipócitos (GUAL *et al.*, 2003b). O estresse hiperosmótico em leveduras e em células renais de mamíferos causa ativação da cascata de homólogos da MAPquinase (LANG *et al.*, 1998).

Hormônios, como a insulina, podem afetar o volume celular por alterarem o transporte de aminoácidos através da membrana plasmática. Esses efeitos causam alterações no gradiente de sódio, o que influencia o transporte ativo secundário de aminoácidos. O acúmulo de potássio pela ativação da Na^+/K^+ -ATPase leva à hiperpolarização do potencial de membrana. A hiperpolarização induz o transporte de aminoácidos pelo sistema A, controlado pela insulina (tendência a aumentar o tamanho da célula) (LANG *et al.*, 1998).

Segundo GILLES (1982) os crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: a regulação anisomótica do fluido extracelular, que tem por objetivo controlar a osmolaridade do meio interno; e a regulação isomótica do fluido intracelular, que tem o intuito de mantê-lo isomótico em relação ao extracelular. A regulação isomótica do líquido intracelular implica em duas fases de controle do volume celular. A primeira fase é relativa às respostas imediatas de alteração do volume celular, como consequência de choques osmóticos e envolve a plasticidade da membrana plasmática. A segunda fase do reajuste do volume celular está relacionada com

eventos de influxo e efluxo de osmólitos, tanto orgânicos (aminoácidos livres) como inorgânicos (Na^+ , Cl^- , K^+) (GILLES, 1998a,b; GILLES e DELPIRE, 1997).

O íon K^+ é o principal efetor inorgânico durante os choques hiperosmóticos, pois proporciona uma limitação imediata da alteração excessiva do volume celular durante alterações osmóticas do meio extracelular. Entretanto, os efetores orgânicos, como aminoácidos, betaína e glicerol são considerados como principais responsáveis pelo reajuste do volume celular durante alterações osmóticas do meio extracelular (GILLES, 1998a,b; GILLES e DELPIRE, 1997).

Diversos estudos em diferentes espécies de crustáceos sugerem um controle neuroendócrino sobre o mecanismo osmorregulatório. (MANTEL, 1985; MCNAMARA *et al.*, 1990; ECKHADT *et al.*, 1995; FEIRE *et al.*, 1995).

FREIRE *et al.* (1995) investigaram a participação de fatores neuroendócrinos, presentes no Sistema Nervoso Central, sobre a regulação da concentração de aminoácidos livres (AAL) hemolinfáticos no camarão de água doce *Macrobrachium olfersii*. Os autores descreveram que a concentração total de AAL da hemolinfa diminui após exposição do animal ao meio hiperosmótico. Nos animais mantidos em água doce, a exposição ao homogenado do pedúnculo ocular aumentou a quantidade de AAL da hemolinfa. O homogenado de gânglio torácico aumentou a quantidade de AAL na hemolinfa de animais submetidos ao estresse hiperosmótico. Assim, a concentração total de aminoácidos da hemolinfa é modificada pelo estresse porque participa da regulação anisomótica e vários fatores neuroendócrinos estão envolvidos com esta regulação.

Em *C. granulata* o aumento da captação de aminoácidos e a síntese de betaína foram demonstrados em tecidos de animais expostos ao estresse hiperosmótico (SCHEIN *et al.*, 2005; JAHN, 2001). Em tecidos de *C. granulata*, submetidos ao estresse hiperosmótico *in vitro*, foi verificada uma diminuição da síntese de proteínas. Contudo, quando os tecidos eram expostos ao estresse hiposmótico *in vitro*, foi observado aumento da capacidade de síntese (BOCK, 2005).

Está bem documentado na literatura que em áreas estuarinas e intertidais, as flutuações constantes da salinidade impõem um estresse iônico e ambiental à sua biota. Essas variações de salinidade levam os organismos estuarinos e marinhos intertidais a mudanças na composição orgânica e inorgânica dos fluidos corporais, bem como de suas reservas energéticas, o que permite aos animais a execução dos ajustes homeostáticos compensatórios (KASSCHAU *et al.*, 1984; MATSUSHIMA e YAMADA, 1992; BISHOP e BURTON, 1993; OKUMA e ABE, 1994; PILLET *et al.*, 1995).

A capacidade osmorreguladora desempenha um importante papel na evolução e na conquista do habitat estuarino pelos organismos. Nos crustáceos eurialinos, a osmolaridade do fluido extracelular pode variar de maneira diversa em função da osmolaridade do meio ambiente. Entre os crustáceos decápodes, encontram-se desde animais estuarinos eurialinos capazes de tolerar grandes variações na salinidade do meio e com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa – osmorreguladores – até espécies cuja pressão osmótica extracelular pode variar amplamente – osmoconformadores (MANTEL e FARMER, 1983).

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae), que evoluiu a partir de formas marinhas, é uma espécie tipicamente estuarina. Ele habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o RS, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o Golfo de San Martin, na Argentina (BOTTO e IRIGOYEN, 1980).

Na Lagoa de Tramandaí-RS (habitat natural desse animal) a salinidade pode variar de 0,22 ‰ a 34 ‰ e a concentração de O₂ dissolvida na água varia de 2,80 mg O₂/L a 11,78 mg O₂/L, podendo chegar a valores próximos de zero durante o inverno (BOTTO e IRIGOYEN, 1980; TURCATO, 1990).

Quanto ao hábito alimentar, esta espécie pode ser considerado generalista, com estratégias alimentares detritívora e oportunista (D'INCAO *et al.*, 1990). Eventualmente comporta-se como canibalista, atacando suas próprias comunidades (BOTTO e IRIGOYEN, 1980).

O caranguejo *C. granulata* pode ser encontrado entre os pisos supra e mesolitorâneos, em áreas inundáveis com ou sem vegetação halo-hidrófila. Nesses locais eles abrem galerias ou tocas com profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático, fazendo com que haja sempre água no fundo da toca. Essas habitações têm papel importante na ecofisiologia deste crustáceo, na medida que minimizam as amplitudes de variações de salinidade e temperatura (TURCATO, 1990).

Conforme BROMBERG (1992), *C. granulata* pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, uma vez que suporta amplas variações de

salinidade, sendo capaz de hiperregular de 0⁰/₀₀ a 20⁰/₀₀ e hiporregular em 40⁰/₀₀. O ponto isosmótico situa-se entre 28,5⁰/₀₀ e 30⁰/₀₀, no inverno e no verão, respectivamente. A autora destacou o processo de regulação isosmótica intracelular como parte dos mecanismos envolvidos na adaptação desse caranguejo a meios com diferentes salinidades, visto que as concentrações hemolinfáticas de íons sofreram consideráveis alterações após os choques osmóticos.

No seu habitat o *C. granulata* permanece por longos períodos fora da água, sendo considerado semi-terrestre (MAÑE-GAZON *et al.*, 1974). Contudo, o Sistema Respiratório desses animais está pouco adaptado à respiração aérea (SANTOS *et al.*, 1987). Essa espécie possui cinco pares de brânquias anteriores e três pares de brânquias posteriores, dispostas nos mesmos segmentos torácicos. Uma das estratégias para a conquista do meio terrestre foi a interiorização das brânquias na cavidade branquial, determinada pelo prolongamento da carapaça. Desta forma, ao sair do ambiente aquático, o animal mantém as brânquias umedecidas através da retenção de água nesta cavidade (BOND-BUCKUP *et al.*, 1991).

Durante o processo de aclimação ao estresse osmótico, provavelmente, o tecido branquial é o que mais consome energia, uma vez que ele deve assegurar a regulação isosmótica do fluido extracelular, como também a regulação anisomótica do fluido intracelular.

Estudos sobre as respostas fisiológicas do tecido branquial de crustáceos eurialinos, durante o processo de adaptação ao estresse osmótico, mostram

alterações: no consumo de oxigênio, na proliferação das células de cloreto ricas em mitocôndrias, nas atividades das enzimas Na^+/K^+ - ATPase e anidrase carbônica, na capacidade de oxidação total de aminoácidos, assim como mudanças quantitativas nos fosfolípidios de membrana e no conteúdo de ATP do tecido (COPELAND e FIZJARRELL, 1968; WHITNEY, 1974; ENGEL *et al.*, 1975; PIERCE, 1982; GILLES, 1982; PÉQUEUX e GILLES, 1988; HENRY, 1988a, b).

Está descrito na literatura que o tecido branquial de crustáceos apresenta uma diferenciação funcional e estrutural. As brânquias anteriores apresentam um epitélio do tipo respiratório e não sofrem alterações significativas na sua estrutura quando ocorrem variações de salinidade no meio. Já nas brânquias posteriores, a atividade osmorreguladora é predominante e, dependendo da salinidade do meio no qual se encontra o animal, o processo de transporte de cloreto de sódio pode ser ativado ou inibido. Também nessas brânquias ocorrem modificações na ultraestrutura do epitélio de transporte, com um aumento nas vilosidades da membrana apical e no número de mitocôndrias, indicando elevação do metabolismo oxidativo, do consumo de oxigênio e da produção de dióxido de carbono (WELLCOMME e DEVOS, 1991; CHAUSSON e REGNAULT, 1995; PÉQUEUX e GILLES, 1984).

Diferenças morfológicas e ultra-estruturais já foram descritas em brânquias de *C. granulata*. Durante a aclimação ao estresse (hiper ou hiposmótico) e epitélio das brânquias anteriores não apresentou variações na espessura, sugerindo uma função respiratória. Em contraste, a espessura epitelial das brânquias posteriores aumentou significativamente em ambos os estresses. As

brânquias posteriores estão envolvidas tanto com a captação quanto com a secreção de íons dependendo do meio de aclimação (GENOVESE *et al.*, 2000; LUQUET *et al.*, 2002).

Além disso, CASTILHO *et al.* (2001) descreveram que a atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e a sua afinidade por sódio foram maiores nas brânquias posteriores do que nas anteriores de *C. granulata*, sugerindo a presença de diferentes isoformas dessa enzima nas brânquias anteriores e posteriores. A atividade desta enzima está diminuída tanto nas brânquias anteriores quanto nas posteriores de caranguejos aclimatados a trinta dias de estresse hiperosmótico. Já o estresse hiposmótico aumentou a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ somente nas brânquias posteriores.

Ao longo das últimas décadas, a Fisiologia Comparada e o uso de espécies marinhas ou de água doce como modelo biológico, possibilitaram um conhecimento mais aprofundado sobre a Fisiologia Renal, sobre os processos de transporte epitelial e sobre a regulação de volume celular de mamíferos. A prova da presença de processos secretórios nos rins, usando peixe aglomerular, a elucidação de mecanismos de secreção transepitelial em túbulos renais de linguado, a formulação de um modelo para o transporte ativo de cloro a partir de estudos com a glândula retal de tubarão e a demonstração do papel dos aminoácidos como osmólitos orgânicos na regulação do volume celular em estudos com invertebrados aquáticos eurialinos são alguns dos maiores exemplos da contribuição da Fisiologia Comparada (KINNE, 1993).

O caranguejo *C. granulata*, que apresenta excelente adaptação às condições experimentais de laboratório, pode ser considerado um modelo biológico adequado para a investigação do metabolismo intermediário e sua regulação frente a diferentes condições fisiológicas e ambientais. A investigação sobre estresse osmótico em *C. granulata* tem um aspecto interessante, pois neste animal é possível realizar estresse osmótico do tecido branquial *in vivo*, onde as brânquias entram em contato direto com o meio externo. Em mamíferos, as investigações nesse sentido são realizadas com células em cultura e não com o organismo como um todo. O entendimento dos mecanismos pelos quais os crustáceos eurialinos, como o *C. granulata*, utilizam para sobreviver nessas situações pode esclarecer pontos ainda obscuros existentes sobre os mecanismos celulares desencadeados por processos de regulação osmótica em vertebrados.

As brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* estão em contato direto com o meio externo e precisam dispor de mecanismos regulatórios osmóticos que possibilitem ajustes rápidos às variações de salinidade impostas pelo ambiente estuarino. Já foi demonstrado que fatores neuroendócrinos influenciam os processos de osmorregulação em crustáceos (FREIRE *et al.*, 1995.).

Em células de mamíferos a transdução do sinal insulínico é alterada em resposta ao estresse osmótico. As brânquias de *C. granulata* possuem receptor para insulina e este hormônio estimula a captação de glicose e a síntese de glicogênio neste órgão. Desta forma as brânquias que exercem funções de osmorregulação e respiração são um excelente modelo biológico para a resposta

à pergunta: “As características do receptor insulínico e a transdução do sinal são alteradas pelo estresse osmótico?”.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito do processo de aclimação ao estresse hipo ou hiperosmótico sobre as características do receptor à insulina e sobre a captação de glicose em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulata*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Clonar e sequenciar parcialmente o receptor relacionado à insulina das brânquias de *Chasmagnathus granulata*.
- b) Determinar a concentração e a afinidade dos receptores à insulina em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulata* submetidos a estresse hiper ou hiposmótico
- c) Estudar a fosforilação do substrato sintético poly (Glu; Tyr 4:1) em preparações de membranas plasmáticas de brânquias anteriores e posteriores de caranguejos submetidos a estresse hiper e hiposmótico.
- d) Investigar a captação de glicose em tecido branquial de caranguejos submetidos a estresse hiper ou hiposmótico

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Os produtos utilizados tinham as seguintes procedências: Tris (hidroximetilaminometano) da Aldrich; Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), ortovanadato de sódio, trifosfato de adenosina (ATP), o polímero sintético poly (Glu; Tyr) 4:1, IGF-I recombinante humano (hIGF-I) e a angiotensina-I humana, 2,5-Dipheniloxazola (PPO), 1,4-bis[2-(5-feniloxazonil-benzeno) (POPOP), Hepes, da Sigma; Triton X-100, ácido acético, ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA), sulfonil dodecil de sódio (SDS), metanol, cloreto de sódio, sacarose, cloreto de manganês ($MnCl_2$), cloreto de magnésio ($MgCl_2$), cloreto de cálcio ($CaCl_2$), bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), cloreto de potássio (KCl) da Merck; Ácido tricloroacético (TCA), ácido ortofosfórico e tolueno, da Nuclear; Sulfato de sódio (Na_2SO_4) da Reagen; Brometo de sódio (NaBr) da Vetec; Glicina, albumina de soro bovino (BSA) da Gibco; Genisteína, *coomassie brilliant blue*, da Acros; A insulina bovina foi gentilmente cedida pela Companhia Biobrás (Brasil). Papéis de fosfocelulose da Gibco BRL e papéis filtro (Whatman GF/B 2,4 cm).

Os materiais radioativos, [$\gamma^{32}P$] ATP (300mCi/nmol), ^{125}I -insulina (50,000 contagens/min (cpm/min) de Tyr $^{A14-125}I$ -monoiodoinsulina humana, 2,000 Ci/mmol de atividade específica) e 1- $[^{14}C]$ 2-deoxi-D-glucose ($[^{14}C]$ DG – 39mCi/mmol), foram obtidos da *Amersham Bioscience*.

Os equipamentos utilizados foram: refratômetro (ATAGO S/MILL); homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com pistilo de teflon, homogeneizador Omni Mixer e o homogeneizador tipo Dounce (Konté Glass Co USA). As centrífugas foram a Sorval RC-5B e centrífuga de eppendorff da Sanyo. Foi utilizado ainda

agitador metabólico Dubnoff. Para os experimentos de biologia molecular, foram utilizados, termociclador (PTC – MJ Research), GeneQuant (Pharmacia Biotech) todos os Kits e reagentes utilizados foram da Biogen, Invitrogen e Gibco. A radioatividade foi medida em contador de cintilação beta ou contador gama LKB

Os programas estatísticos utilizados foram Jandel SigmaStat, versão 2.0. e Prism4.

2. Animais

Foram utilizados caranguejos machos da espécie *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851 – Decapoda-Grapsidae), no estágio C de intermuda (DRACH e TCHERNIGOVZEFF, 1967). Os animais foram coletados no município de Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil, na população natural da margem Leste da Lagoa de Tramandaí (coordenadas 29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste).

O ambiente onde vivem é tipicamente de estuário, influenciado tanto pelas águas do oceano Atlântico, como pelas águas de origem pluvial do sistema lagunar de Tramandaí, onde o nível das águas é influenciado pelos ventos (WÜRDIG, 1984). O clima da região é considerado subtropical úmido, com temperatura média anual de 17,6°C e precipitação pluviométrica inferior a 1300 mm anuais (MORENO, 1961).

As coletas foram realizadas com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (Portaria 332/90). Os animais foram capturados manualmente no sedimento areno-lodoso, dentro da

água ou nas tocas e transportados até o laboratório em caixas plásticas com água do próprio local.

O número de animais utilizados nos experimentos desta Tese foi de aproximadamente 300.

3. Manutenção dos animais

Ao chegarem ao laboratório, os animais eram submetidos a um choque hiposmótico (água destilada) por 24 horas, com a finalidade de eliminar possíveis parasitas e limpar seu conteúdo estomacal (KUCHARSKI, 1997). A seguir, os caranguejos eram aclimatados ao laboratório por um período de 15 dias, mantidos em aquários com oxigenação constante, com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C e fotoperíodo natural. Os animais foram alimentados com carne bovina crua, *ad libitum*, diariamente ao fim da tarde. Estes animais foram considerados animais controle ou o tempo zero (0 horas) de estresse.

4. Estresse osmótico *in vivo*

Após o período de aclimação os animais foram submetidos durante 24, 72 e 144 horas ao estresse hiper ou hiposmótico. Os animais submetidos ao estresse hiperosmótico foram colocados em aquário com salinidade de 34 ‰ (água destilada e sal marinho). Essa salinidade foi a mais alta encontrada por TURCATO (1990) no local de coleta desses caranguejos. Os animais submetidos ao estresse hiposmótico foram colocados em aquários com água destilada (salinidade 0‰). A salinidade dos aquários foi controlada semanalmente com refratômetro (ATAGO S/MILL).

Durante os períodos de estresse, os animais eram mantidos em aquários com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, aeração e alimentação do período de aclimatação.

5. Procedimentos experimentais

Os animais foram crioanestesiados por imersão em recipiente com gelo escama, durante 10 minutos. A seguir a carapaça era removida e as brânquias anteriores e posteriores excisadas pela base e utilizadas nos diferentes procedimentos experimentais.

6. Preparação das membranas plasmáticas do tecido branquial

As membranas plasmáticas das brânquias foram preparadas segundo KUCHARSKI *et al.* (1999), com algumas modificações. Para cada preparação de membrana, aproximadamente 15 animais foram utilizados. As brânquias anteriores e posteriores foram preparadas separadamente. Os tecidos foram homogeneizadas em um homogeneizador tipo Potter - Elvehjem com pistilo de teflon, na presença de uma solução de homogeneização, contendo: 40 mM de Tris; 1mM de PMSF; 1mM de EDTA; 250mM de sacarose, pH 7,4.

O homogeneizado foi centrifugado a 3000 *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 30000 *g*, por 20 minutos, sempre a 4°C. O precipitado formado a partir desta centrifugação foi ressuspensionado em tampão contendo Hepes (25mM) e PMSF (1mM) com um homogeneizador tipo Dounce. Amostras foram separadas e congeladas a -20°C até sua utilização.

7. Dosagem de proteínas

Aproximadamente 50µl da solução contendo as membranas plasmáticas das brânquias anteriores ou posteriores foi separada e posteriormente utilizada para dosagem de proteínas. A concentração de proteínas foi determinada através do método de BRADFORD (1976) com o *Coomassie brilliant blue*, utilizando BSA como controle.

8. Ensaio da ligação da ¹²⁵I-insulina em presença de diferentes concentrações de insulina bovina

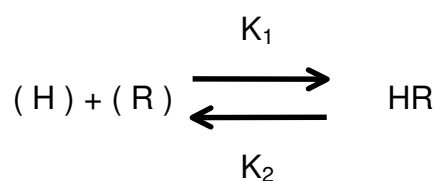
Para cada amostra de membrana foram utilizados de 10 a 15 animais e cada ponto da curva corresponde a uma média de 3 a 5 amostras de membranas plasmáticas de cada grupo experimental: 1) caranguejos controles (0 horas de estresse), 2) caranguejos expostos a 144 horas de estresse hiperosmótico, 3) caranguejos expostos às 24 horas de estresse hiposmótico.

As preparações de membrana plasmática do tecido branquial (0,4 a 0,5 mg de proteína) foram incubadas em agitador metabólico *Dubnoff* em presença de 0,2 ml de 10mM HEPES, 400mM NaCl (estresse hiperosmótico) ou 300mM (estresse hiposmótico e controle), 1mM PMSF e 1% BSA, com pH 7.4. A essa solução foram adicionadas concentrações crescentes de insulina bovina não marcada (0-10µM) e 50.000 contagens/minuto de Tyr^{A14-125}I-monoiodoinsulina humana (2.000 Ci/mmol de atividade específica) (PÁRRIZAS *et al.*, 1994). Após incubação por 120 minutos a 25⁰C (KUCHARSKI *et al.*, 1997), a ¹²⁵I-insulina ligada às membranas foi separada do hormônio livre por filtração através de um filtro de

microfibra de vidro (Whatman GF/B 2,4 cm) adaptado a uma bomba de vácuo. Os filtros foram lavados três vezes com 10 ml de tampão de incubação gelado contendo 0,1% de BSA e a radiatividade retida foi contada em contador de cintilação gama LKB. A radioatividade absorvida pelo filtro na ausência de membranas foi menor que 0.2% da contagem total.

Para análise dos sítios de ligação da insulina foram utilizados os dados da curva de competição que foram lançados em um gráfico. O método gráfico utilizado para análise dos dados da união de ligandos a proteínas foi o método de Scatchard (SCATCHARD, 1949). O gráfico de Scatchard resulta em uma reta onde a inclinação da mesma informa sobre a constante de dissociação (K_d) e a interseção da reta com o eixo das abcissas indica a capacidade de união, o B_{max} .

A interação entre o hormônio e o receptor forma um complexo que é reversível e representado pela seguinte reação:



onde K_1 e K_2 são as constantes de velocidade de associação e dissociação, respectivamente. Quando o sistema atinge o equilíbrio, para cada complexo de HR formado, dissocia-se um outro HR em H e R. A velocidade da reação é a mesma nos dois sentidos e a constante de associação (K_a), pode ser calculada como:

$$K_a = \frac{[HR]}{[H] \cdot [R]}$$

onde [HR] é a concentração do complexo hormônio-receptor, [H] é a concentração de hormônio livre e [R] é a concentração de receptores não ocupados. Quando metade dos receptores estiverem ligados ao hormônio, [R] será igual a [HR]. A constante de associação corresponde ao K_a e seu inverso K_d a constante de dissociação. Desta forma, a concentração de hormônio livre necessária para saturar metade dos receptores será igual ao K_d . Assim, os valores de K_d foram expressos em molaridade ($10^{-15}M$) e utilizados como um índice de afinidade dos receptores. Pode-se estabelecer que quanto menor o K_d , maior a afinidade do hormônio por seu receptor e menor a tendência de dissociação do complexo hormônio receptor (SANVITTO, 1992).

Com o objetivo de testar a especificidade da ligação da ^{125}I -insulina aos receptores, foram realizados experimentos utilizando-se membranas plasmáticas incubadas por 150 minutos a $25^{\circ}C$ com ^{125}I -insulina (50,000 contagens/minuto) em presença ou ausência de angiotensina-I ($250\mu g/ml$), sendo processados com descrito anteriormente. A captação total de ^{125}I -insulina foi medida na ausência da insulina bovina não marcada. A captação não específica foi determinada pela adição ao meio de incubação (*in vitro*) de ^{125}I -insulina mais um excesso de insulina bovina não marcada. A captação específica foi determinada pela subtração do não específico da captação total (TURYN *et al.*, 1986).

9. Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1)

Para cada amostra de membrana foram utilizados de 10 a 15 animais e cada ponto da curva corresponde a uma média de 3 a 5 amostras de membranas plasmáticas de cada grupo experimental: 1) caranguejos controles (0 horas de estresse); 2) estresse hiperosmótico (24, 72 e 144 horas), 3) estresse hiposmótico (24, 72 e 144 horas).

As membranas plasmáticas das brânquias (40µg de proteína) foram incubadas com três tratamentos: 200 nM de insulina bovina, 200nM de albumina bovina (controle) ou 500µM de genisteína + 200nM de insulina bovina, na presença de uma solução contendo 10mM de MnCl₂, 10mM de MgCl₂ e 1mM de ortovanadato de sódio, em um volume final de 45µl por 30 minutos a 25°C. A seguir, este material foi incubado por 10 minutos a 25°C com 0,5 µCi/mM [γ ³²P] ATP juntamente com ATP não marcado (5µM). Após foi adicionado, por mais uma hora a 25°C, 1 mM do substrato sintético poly (Glu,Tyr) 4:1. A reação foi interrompida, pipetando-se a amostra do meio de incubação em um papel de fosfocelulose (ARONOWSKI *et al.*, 1992). Seguiu-se uma lavagem com TCA a 10% e três lavagens com ácido fosfórico (75mM). Os papéis foram colocados em líquido de cintilação e a incorporação de [δ ³²P] ATP ao substrato exógeno foi medida em um contador beta LKB.

10. Captação de [¹⁴C] 2-deoxi-D-glucose

Foram utilizados de 5 a 8 animais para cada grupo experimental: 1) controles (0 horas de estresse); 2) estresse hiperosmótico (24, 72 e 144 horas), 3) estresse hiposmótico (24, 72 e 144 horas).

Para esse experimento, as brânquias anteriores e posteriores foram removidas de animais anestesiados como descrito previamente, e a cutícula de quitina foi cortada e os tecidos foram imediatamente lavados em tampão de incubação. Foram utilizadas as 3 últimas brânquias anteriores e as 3 últimas posteriores de cada animal.

Foram utilizados dois tipos de meios de incubação: para o tecido de animais submetidos ao estresse hiperosmótico o meio continha 400mM NaCl, 12,2 mM KCl, 11 mM CaCl₂, 93 mM MgCl₂.H₂O, 31mM NaHCO₃, 278mM Na₂SO₄, 5,8 mM NaBr, 10mM HEPES e 0,1 mM PMSF, pH 7,8, 815 mOsm/kg (osmolalidade da hemolinfa a 34⁰/₀₀ de salinidade foi de 853 ± 12,45 mOsm/kg), equilibrados com 5% CO₂:95% O₂. Para os tecidos dos animais controle e expostos ao estresse hiposmótico foi utilizado o mesmo meio, porém com a concentração de NaCl modificada para 300mM (a osmolalidade da hemolinfa na salinidade de 0⁰/₀₀ foi 636 ± 18,01 mOsm/kg - n=10 - e no grupo controle (20⁰/₀₀) foi de 719 ± 10,41 mOsm/kg - n=10) (SCHEIN *et al.*, 2005).

As brânquias foram incubadas por 120 minutos (KUCHARSKI *et al.*, 2002) em 500µl de tampão de incubação com 0.2 µCi de 1-[¹⁴C] 2-deoxi-D-glicose ([¹⁴C] DG).

Após as amostras foram removidas do meio de incubação, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada (com o objetivo de retirar o excesso de

radioatividade absorvida ao tecido), secas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo 1ml de água destilada. Após, esses frascos foram congelados e fervidos por três vezes para romper as células e liberar os traçadores (glicose radioativa) do tecido branquial. Esse conteúdo liberado foi considerado o meio interno e o meio de incubação, o meio externo.

De cada amostra foram retirados 100µl do meio interno ou do meio externo e colocados em líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em contador LKB. Os resultados foram expressos como a relação tecido / meio (T/M), isto é, cpm / ml de fluido de tecido dividido por cpm / ml do meio de incubação.

11. Extração do RNA total

Foram utilizadas brânquias posteriores de animais controle para a realização dos experimentos de investigação molecular. A extração do RNA total foi realizada através do método da guanidina – tiocianato (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987).

12. Clonagem parcial do cDNA do receptor semelhante à insulina de crustáceo (CGIRLTK)

RNAs poliadenilados foram isolados usando oligodT acoplados a beads magnéticos como descrito pelo fabricante (Dynal). Transcrição reversa foi realizada usando oligo(dT)₁₇ como *primer*, 1µg mRNA e 200 U de transcriptase reversa (Moloney murine leukemia virus - Promega). cDNAs foram usados como moldes para amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando dois *primers* degenerados (5´GAAATNGNCGAYGGNATGGCNTA-3´ e 5´TCATNCCRAARTCNCCRATYTT-3´) para anelar a conservada região consenso

do domínio tirosina quinase do receptor da família da insulina/IGF-I de humanos (X0443.4, NM_000208), mosca da fruta (M14778), bicho-da-seda (AF025542), rato (NP_034698.1 e NP_058767.1) peixe (AF321225). O PCR foi realizado com um volume total de 50 μ l com 10 ng of cDNA das brânquias posteriores em 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, contendo 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 0.2 mM de cada dNTP, 1 μ M of cada *primer*, 1.5 mM MgCl₂ e 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega). As amplificações foram realizadas por 40 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min e o passo de extensão final a 72°C por 5 min. Produtos do PCR foram corridos em gel de agarose a 1.5% e os fragmentos do tamanho exposto (118bp) foram purificados, subclonados em pGEM-T usando um kit de clonagem TA (Promega) e seqüenciado com um kit de seqüenciamento (ABI Prism BigDye Terminator Cycle -PE Applied Biosystems). As seqüências foram comparadas usando múltiplo alinhamento de algoritmo Clustal W (HIGGINS e SHARP, 1989). O número de registro no *Genbank* desta seqüência é DQ104241.

13. Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média mais ou menos (\pm) o erro padrão da média (EPM). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois pontos foi feita usando-se o teste t de *Student* para dados não pareados. Para comparação entre tempos de estresse e tipo de estresse ou diferentes tratamentos e tempos de estresse foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas vias; para comparação entre os diferentes tempos de estresse foi utilizada ANOVA de uma via, ambas seguidas pelo *Student-Newmann-Keuls* (SNK). A análise dos sítios de ligação à insulina foi realizada pelo método de

SCATCHARD (1949). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas se $P < 0,05$.

Todos os testes foram realizados com o programa estatístico *Sigma Stat 2.0*, com exceção análise dos sítios de ligação à insulina que foram feitas com o programa *Prism 4*.

TRABALHOS DESENVOLVIDOS

CAPÍTULO 1

Characterization of insulin receptors in gills from crabs submitted to hyperosmotic stress

Autores: Márcia Trapp, Vanessa Schein, Yann Waché, Alan Pöpl, Edison Capp, Luiz Carlos Kucharski, Pascal Favrel, Alain Van Wormhoudt, Roselis S. M. Da Silva

Periódico: FEBS Letters

Artigo submetido, Agosto 2005

**Characterization of insulin receptors in gills from crabs submitted to
hyperosmotic stress**

Márcia Trapp^a, Vanessa Schein^a, Yann Waché, Alan Pöppl^a, Edison Capp^a, Luiz Carlos Kucharski^a, Pascal Favre^b, Alain Van Wormhoudt^c, Roselis S. M. Da Silva^a

^a Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, RS, Brazil

^b Université de Caen, IBFA, IFREMER UMR 100 «PE2M » Biologie et Biotechnologies marines, 14032 Caen, France;

^c UMR CNRS Museum 5178, Station de Biologie Marine du Muséum National d'Histoire Naturelle, BP225, 29900 Concarneau, France

Correspondence to:
Dr. Roselis S.M. da Silva
Departamento de Fisiologia – ICBS- UFRGS
Rua Sarmento Leite, 500
90050-170 Porto Alegre – RS- Brazil
Fone: +55 51 3316 3623
Fax: +55 51 3316 3453
e-mail: roselis@ufrgs.br

Abstract

Insulin receptor tyrosine kinase domain of the *Chasmagnathus granulata* crab was cloned and sequenced and presented a similarity to vertebrate and invertebrate insulin receptor. Insulin receptor was autophosphorylated after insulin stimulation. Hyperosmotic stress led to a decrease of concentration and affinity of insulin receptors, as well as a reduction of tyrosine kinase activity. Glucose uptake in the posterior gills did not change during the time of osmotic stress. These experiments demonstrate that hyperosmotic stress changes the insulin transduction mechanism, producing insulin resistance in the posterior crab gills.

Key words: crab gill; insulin receptor; molecular cloning

1. Introduction

Insulin receptor belongs to a superfamily of tyrosine kinase receptors (RTKs) with a common evolutionary origin [1]. Homologues to the insulin/IGF receptor have been identified in invertebrates, and presented several structural similarities to the insulin receptor of vertebrates, especially the β subunit tyrosine kinase region [2]. Insulin signal transduction also appears to be preserved in these animals, and is similar to mammals signalling pathways [3].

In vertebrates, stress factors, such as osmotic stress, modify the insulin signal transduction in a tissue-specific manner. When placed under hyperosmotic stress, adipocytes show insulin-resistance, diminishing insulin receptor substrate I (IRS-I) phosphorylation. Nevertheless, the muscle increases the insulin action and glucose transporter (GLUT4) translocation [4].

The *Chasmagnathus granulata* is a euryhaline crustacean that lives in estuaries along the southern Brazilian coast where salinity ranges from 0.22 to 34⁰/₀₀. Posterior gills are considered one of the organs responsible for osmoregulation in this crab [5]. Previous studies in our laboratory identified insulin binding sites and insulin-stimulated tyrosine kinase activity in the gills of this animal [6-7].

Gill face the environment directly, thus they are good models to investigate molecular adaptations to salinity changes in the intact animal *in vivo*. In order to determine the effects of acclimation to hyperosmotic conditions, *in vivo*, on the insulin receptors in posterior gills, the present study was designed (1) to characterize the partial sequence of the insulin receptor cDNA (DQ104241) expressed in *C. granulata* posterior gills; (2) to analyse the insulin receptor concentration and affinity, tyrosine kinase activity, and glucose uptake in posterior gills from crabs submitted to hyperosmotic stress.

2. Materials and methods

2.1. Experimental procedure

Male crabs from Tramandaí Lagoon (RS, Brazil), weighing 15 ± 2 g, were acclimated in aquaria at 20‰ salinity, at 25^o C and natural light/dark cycle. They received meat once a day *ad libitum*, for 2 weeks (control group-CG). Afterwards, the animals were submitted to hyperosmotic stress (34‰ of salinity; stress groups-HG) for 24, 72 or 144h under the same conditions described above.

2.2. Total RNA extraction

Total RNA extraction was made from CG following the guanidine thiocyanate method [8].

2.3. Insulin receptor cloning

Polyadenylated RNAs were isolated using oligodT coupled to magnetic beads as described by the manufacturer (Dyna). Reverse transcription was carried out using oligo(dT)₁₇ as primer, 1 µg mRNA and 200 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega). cDNAs were used as templates for polymerase chain reaction (PCR) amplifications using two degenerated primers (5' GAAATNGNCGAYGGNATGGCNTA-3' and 5' TCATNCCRAARTCNCCRATYTT-3') designed to anneal to conserved consensus regions of the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor family tyrosine kinase encoding domain of sequences from human (X0443.4, NM_000208), fruit fly (M14778), silkworm (AF025542), mouse (NP_034698.1), fish (AF321225), rat (NP_058767.1). PCR was performed in a total volume of 50 µL with 10 ng of posterior gill cDNA in 10 mM Tris/HCl, pH 9.0, containing 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 0.2 mM each dNTP, 1 µM of each primer, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U *Taq* DNA polymerase (Promega). Amplification was performed for 40 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were resolved on a 1.5% agarose gel and fragments of the expected size (118bp) were purified, subcloned into pGEM-T using a TA cloning kit (Promega) and sequenced with an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems). Sequences were compared using Clustal W multiple alignment algorithm [9].

2.4. Gill Membrane Preparation

Posterior gill membrane preparation (15 crabs for each samples) was performed according to Kucharski et al. [7]. The protein concentration was determined using the Bradford method [10].

2.5. Insulin-binding assay

Gill membranes (0.4 - 0.5 mg protein) from crabs exposed to 0h (CG) and 144h of hyperosmotic stress were incubated in 10mM HEPES, 300mM (CG) or 400mM (HG) NaCl, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1% bovine serum albumin (BSA) (pH 7.4), with increasing concentration of unlabelled bovine insulin (0-10 μ M) or 250 μ g/ml of human angiotensin I and radiolabelled insulin (5×10^4 cpm of human Tyr^{A14-125}I-monoiodoinsulin, 2,000 Ci/mmol, Amersham Bioscience) [11]. After incubation for 120 min at 25 $^{\circ}$ C, the ¹²⁵I-insulin was determined according to Kucharski et al. [7].

2.6. Substrate phosphorylation

Gill membrane suspensions (40 μ g protein) from CG (0h) and HG (24, 72, 144h) were preincubated with genistein (500 μ M) plus 200nM of bovine insulin, insulin alone or 200mM of BSA (control) for 30 min at 25 $^{\circ}$ C, and incubated with 0.5 μ Ci of [γ ³²P] ATP (300mCi/nmol, Amersham) and unlabelled ATP (5 μ M) in a buffer (25 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, and 2 mM sodium orthovanadate), for 10 min at 25 $^{\circ}$ C. Subsequently, 1 mM poly (Glu: Tyr 4:1) (Sigma) was added for 1h at 25 $^{\circ}$ C. Additional studies were carried out using human IGF-I (200nM). The tyrosine kinase activity in cell membrane suspensions was determined as described by Kucharski et al. [7].

2.7. [¹⁴C] 2-Deoxy-D-glucose Uptake

[¹⁴C] DG uptake from CG (0h) and HG (24, 72 and 144h) was determined according to Kucharski et al. [12]. The osmolality of the incubation buffers was that of haemolymph at 34⁰/₀₀ salinity (853 ± 12.45 mOsm/kg) and at 20⁰/₀₀ salinity (719 ± 10.41 mOsm/kg).

2.8. Statistical analysis

Results were analysed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with posterior Student–Newmann-Keuls (SNK) or by Student's *t*-test. Significant differences were accepted if $P < 0.05$. These tests were performed with Sigma Stat Statistical Software. Binding data were analysed by Scatchard plot [13] with Prism 4 Software.

3. Results

Using degenerated primers deduced from consensus sequences of the insulin receptor superfamily, a cDNA fragment of 118 bp was amplified from cDNA synthesized from RNA extracted from *C. granulata* posterior gills (Figure 1A). This fragment encoding a 39 amino acids peptide (Fig. 1B) was named CGIRLTK (*C. granulata* insulin receptor-like tyrosine kinases), as it displays a high degree of identity ranging from 69% with most mammalian insulin receptors up to 74% with drosophila insulin receptor tyrosine kinase domains.

Figure 2A shows that the specific binding in CG was saturable at low unlabeled insulin concentration. However the figure 2C shows that the specific binding in HG was proportional to unlabelled insulin concentration. Saturability of insulin produced a linear Scatchard plot in CG (Fig. 2B) and HG (Fig. 2D). The resolution of HG curve established a reduction ($P < 0.05$) in the affinity constants and insulin receptor concentration (Table 1). Moreover, angiotensin I was not able to prevent the ^{125}I -insulin uptake by posterior gills membranes in CG.

Incubation of *C. granulata* gill membranes from the control group with bovine insulin increased ($P < 0.05$) the phosphorylation of the exogenous substrate (Fig. 3), however, with genistein plus insulin this effect was inhibited. Hyperosmotic stress significantly reduced the tyrosine kinase activity ($P < 0.05$), and decreased the stimulatory insulin effect in all experimental groups by 75% to 100% ($P < 0.05$) (Fig. 4A). Figure 4B shows a comparison between insulin and IGF-I stimulated phosphorylation. Only insulin was able to increase the synthetic substrate phosphorylation.

Hyperosmotic stress did not significantly modify the glucose uptake by the posterior gills (Fig. 5).

4. Discussion

Insulin-related receptors have been identified and characterized in insects, in molluscs, in worms, in sponges and in cnidarians. They are similar to the insulin receptors of vertebrates and they present highly homologous tyrosine kinase regions [2]. We demonstrate here for the first time the partial molecular cloning of an insulin tyrosine kinase receptor in a crustacean. Although we could not rule out the possibility that the tyrosine kinase encoding fragment recovered in this study could represent another tyrosine kinase receptor, the highest BLAST scores were obtained with both invertebrate and vertebrate insulin or IGF receptor sequences. Sequence alignment and homology comparison of *C. granulata* insulin receptors (CGIRLTK) with vertebrate and invertebrate insulin/IGF receptor gene family members confirmed this conclusion. Previously autophosphorylation and tyrosine kinase activity have been demonstrated in the gills after bovine insulin stimulation [7]. Partial cloning of the tyrosine kinase domain confirmed the presence of insulin-like receptors in gills of the *C. granulata*.

As no crab insulin-like molecule has been isolated so far, bovine insulin was employed since experimental data have demonstrated that mammalian insulin stimulates glucose uptake and glycogenesis in crustaceans [12, 14]. Only bovine insulin was effective to displace the ^{125}I -insulin bound to gill membrane, and the osmotic stress increase the unlabeled insulin necessary to saturate the insulin receptor what could be explain for the increased dissociation in consequence of

the lower affinity. In addition, the linear Scatchard plot of the saturability of unlabelled insulin indicates the presence of a single binding site with low receptor concentration.

In this study we show that the insulin receptor concentration, affinity and tyrosine kinase activity are osmotically regulated in posterior gill cells from an euryhaline crustacean. Hyperosmotic cell shrinkage induces a regulatory cell volume increase, which is first achieved by a short-term activation of ion transport across the membrane [15]. Another cellular strategy to adapt to long-term hyperosmolarity is isoosmotic exchange of ions against low molecular organic osmolytes, which are compatible with protein functions even at high concentrations [16]. Different mechanisms have evolved for intracellular increase of organic osmolyte concentrations, for example, betaine and amino acids accumulation inside the cells due to hyperosmotic upregulation. When exposed to hyperosmotic stress, *in vivo*, the *C. granulata* tissues increased the amino acids uptake and betaine synthesis [17-18].

In general, cell shrinkage supports a catabolic situation and contributes to insulin resistance [15]. In crustaceans the anabolic effects of insulin on the carbohydrate metabolism were found in lobster and crab muscle, and in posterior gills of *C. granulata* [12, 19]. A reduction in insulin receptor concentration and affinity could favour the metabolic catabolism, increasing the proteolysis, or inhibiting the protein synthesis, thus, accumulating intracellular osmolytes. Data from our laboratory show that posterior gills from *C. granulata* when exposed to hyperosmotic stress, *in vitro*, decreased the protein synthesis [20]. Moreover, the Na^+/K^+ -ATPase activity in the posterior gills is increased by insulin administration

(unpublished data). A reduction in concentration and affinity of insulin receptors in posterior gills could favour the decrease of Na^+/K^+ -ATPase activity necessary for homeostatic adjustments during acclimation to hyperosmotic conditions.

Following bovine insulin stimulation, the exogenous substrate was phosphorylated. During osmotic stress the basal and insulin-stimulated tyrosine kinase activities in posterior gills were significantly inhibited. In gills from an euryhaline fish the expression of several MAP kinases, which participate in the insulin signalling transduction mechanism, are inhibited in response to hyperosmotic stress [3, 21]. Insulin involvement during cell adaptations to stress has already been demonstrated in mammals [22], but there are still controversies about the actions of this hormone in cell volume regulation. It was shown that in adipocytes hyperosmotic stress inhibited the insulin signalling transduction mechanism. However, in mammal muscles, osmotic stress increases the tyrosine kinase activity and glucose uptake [4]. In this study the tyrosine kinase phosphorylation reduction probably occurred as a result of the diminished concentration of insulin receptors observed in response to hyperosmotic stress. Moreover, the hyperosmotic stress led the posterior gills to a state of insulin resistance as observed in vertebrate adipocytes [4].

In *C. granulata* posterior gills the reduction in the insulin receptors concentration, affinity and tyrosine kinase activity indicates that this hormone system is involved in the homeostatic cell-volume regulation mechanisms during the acclimation to hyperosmotic stress.

Despite the insulin resistance caused by hyperosmotic stress, no significant reduction in glucose uptake was found in the gills during acclimation to stress.

These results agree with the data obtained in mammalian muscle, showing that hyperosmotic stress *per se* stimulates glucose uptake [4].

Concluding, CGIRLTK presents several characteristics similar to the insulin receptors of other invertebrates and vertebrates, mainly related to tyrosine kinase regions. Insulin receptor is osmotically regulated, *in vivo*, in posterior gills epithelial cells of an euryhaline crustacean, and this regulation is part of the cell adjustments needed to adapt the whole organism during the environmental variations in the osmolality. Furthermore, the insulin signal transduction was affected by hyperosmotic condition. This may be seen as another example of coordination of the physiological process in response to changes of cellular volume in organisms that face a wide spectrum of salinity and need to maintain the homeostasis.

5. Acknowledgements

This work was supported by grants from CAPES/COFECUB n° 322, and CNPq, Brazil. The authors wish thank to Dr Poli Mara Spritzer and Dr Ilma S. Brum da Silva for use of Molecular Laboratory facilities.

6. References

- [1] Chan, S.J. and Steiner, D.F. (2000) *Amer. Zool.* 40, 213-222.
- [2] Pertseva, M.N., and Shpakov, A.O. (2002) *J. Evolution. Biochem. Physiol.* 38, 547-561.
- [3] Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. (2001) *Nature.* 413,799-806.

- [4] Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. Tanti, J.F. (2003) *Diabetes Metab.* 29, 566-575.
- [5] Chausson, F. and Regnault, M., (1995) *Cah. Biol. Mar.* 36, 291-297.
- [6] Kucharski, L.C., Ribeiro, M.F., Schein, V., Da Silva, R.S.M., Marques, M. (1997) *J. Exp. Zool.* 279, 118-125.
- [7] Kucharski, L.C., Capp, E., Chittó, A.L.F., Trapp, M., Marques, M, Da Silva, R.S.M. (1999) *J. Exp. Zool.* 283, 91-4.
- [8] Chomczynski, P. and Sacchi, N (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-9
- [9] Higgins, D.G., Sharp, P.M. (1989) *CABIOS* 5, 151-3.
- [10] Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- [11] Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E.M., Gutiérrez, J. (1994) *Am J. Physiol.* 266, 1944-50.
- [12] Kucharski, L.C., Schein, V., Capp, E., Da Silva, R.S.M. (2002) *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 256-263.
- [13] Scatchard, G. (1949) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 51, 660-67
- [14] Sanders, B. (1983) *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 374-7.
- [15] Schliess, F and Haussinger, D. (2002) *Biol. Chem.* 383 (3-4), 577-83.
- [16] Yancey, P.H.; Blake, W.R.; Conley, J. (2002) *J. Comp. Biochem. Physiol-A.* 133, 667-76.
- [17] Cavagni, G., Jahn, M., Da Silva, R.S.M., Kucharski, L.C. (2002). *XVII Fesbe*, MG, Brazil.
- [18] Schein, V., Chittó, A.L.F, Etges, R., Kucharski, L.C., van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S.M. (2005) *Comp. Biochem. Physiol.-Part B.* 140, 561-567.
- [19] Tanti, J.F. (2003) *J. Biol. Chem.* 278(29), 26550-57.
- [20] Bock, C.; Mammarella, L.; Trapp, M.; Kucharski, L. C.; Da Silva, R. D. (2004) *XIX Fesbe.*, SP, Brazil.
- [21] Kültz, D. and Avila, K. (2001) *Comp. Biochem. Physiol.-Part B* 129, 821-829.
- [22] Häussinger, D. Lang, F., Gerok, W. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, E343-E355.

7. Figures and Legends

A. Posterior gill cDNA (nucleotide sequence – 118pb)

GAGATTGCGGATGGCATGGCATACTGGCGTGGCGGGGCGTGGTGCACCGA
 GACTTGGCGGCCAGAACTGTCTGCTGGACAGGAGCCTCACGCTCAAGATCG
 GAGACTTCGGGATGAG

B. Amino acid sequence of CGIRLTK domain.

EIADGMAYLAWRGVVHRDLAARNCLLDRSLTLKIGDFGM

C

	<i>IRA</i> →		Percent of Homology
CIR		<i>EIADGMAYLAWRGVVHRDLAARNCLLDRSLTLKIGDFGM</i>	
MIPR	1156	<i>EIADGMAYLADKKFVHRDLAARNCMVSEERTVKIGDFGM</i>	1194 81%
DIR		<i>EIADGMAYLAAKKFVHRDLAARNCMVADDLTVKIGDFGM</i>	883 84%
IRBm	1204	<i>EIADGMAYLSAKKFVHRDLAARNCMVAGDLTVKVGDFGM</i>	1242 84%
IRMm	1098	<i>EIADGMAYLAAKKFVHRDLAARNCMVSQDFTVKIGDFGM</i>	1136 79%
IRCa	541	<i>EIADGMAYLSAKKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGM</i>	579 81%
IRRn	1143	<i>EIADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGM</i>	1181 79%
hIR	1142	<i>EIADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGM</i>	1180 79%
hiRR	1118	<i>EIADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGM</i>	1156 76%

←
IR3

(CGIRLTK)insulin-like receptor [Chasmagnathus granulata]DQ104241
 (MIRP)molluscan insulin-related peptide(s)receptor [Lymnaea stagnalis]X8499
 (DIR) insulin-like receptor [Drosophila melanogaster] A56081
 (IRBm)insulin receptor-like protein [Bombyx mori] AF025542
 (IRCa)insulin receptor 1 [Carassius auratus] AF321225
 (IRRn)insulin receptor [Rattus norvegicus] NP_058767.1
 (hIR) human insulin receptor [Homo sapiens] NP_000199.1
 (hiRR)human insulin-like growth factor 1 receptor [Homo sapiens] X0443.4

Figure 1 A: The nucleotide fragment encoding *C. granulata* insulin receptor (CGIRLTK) tyrosine kinase domain from posterior gills (118bp fragment). **B:** Deduced amino acid sequence of CGIRLTK domain. Sequence of primers indicated in italics. **C:** Comparison of CGIRLTK amino acid sequence with other members of the insulin receptor superfamily. Conserved residues are shaded in

black (identical) or in grey (homologous). (CGIRLTK) insulin receptor-like tyrosine kinases [*Chasmagnathus granulata*] **DQ104241**, (MIRP) molluscan insulin-related peptide(s)receptor [*Lymnaea stagnalis*] **X8499**, (DIR) insulin-like receptor [*Drosophila melanogaster*] **A56081**, (IRBm) insulin receptor-like protein [*Bombyx mori*] **AF025542NP 034698.1**, (IRCa) insulin receptor 1 [*Carassius auratus*] **AF321225**, (IRRn) insulin receptor [*Rattus norvegicus*] **NP 058767.1**, (hIR) human insulin receptor [*Homo sapiens*] **NP 000199.1**, (hiRR) human insulin-like growth factor 1 receptor [*Homo sapiens*] **X0443.4**

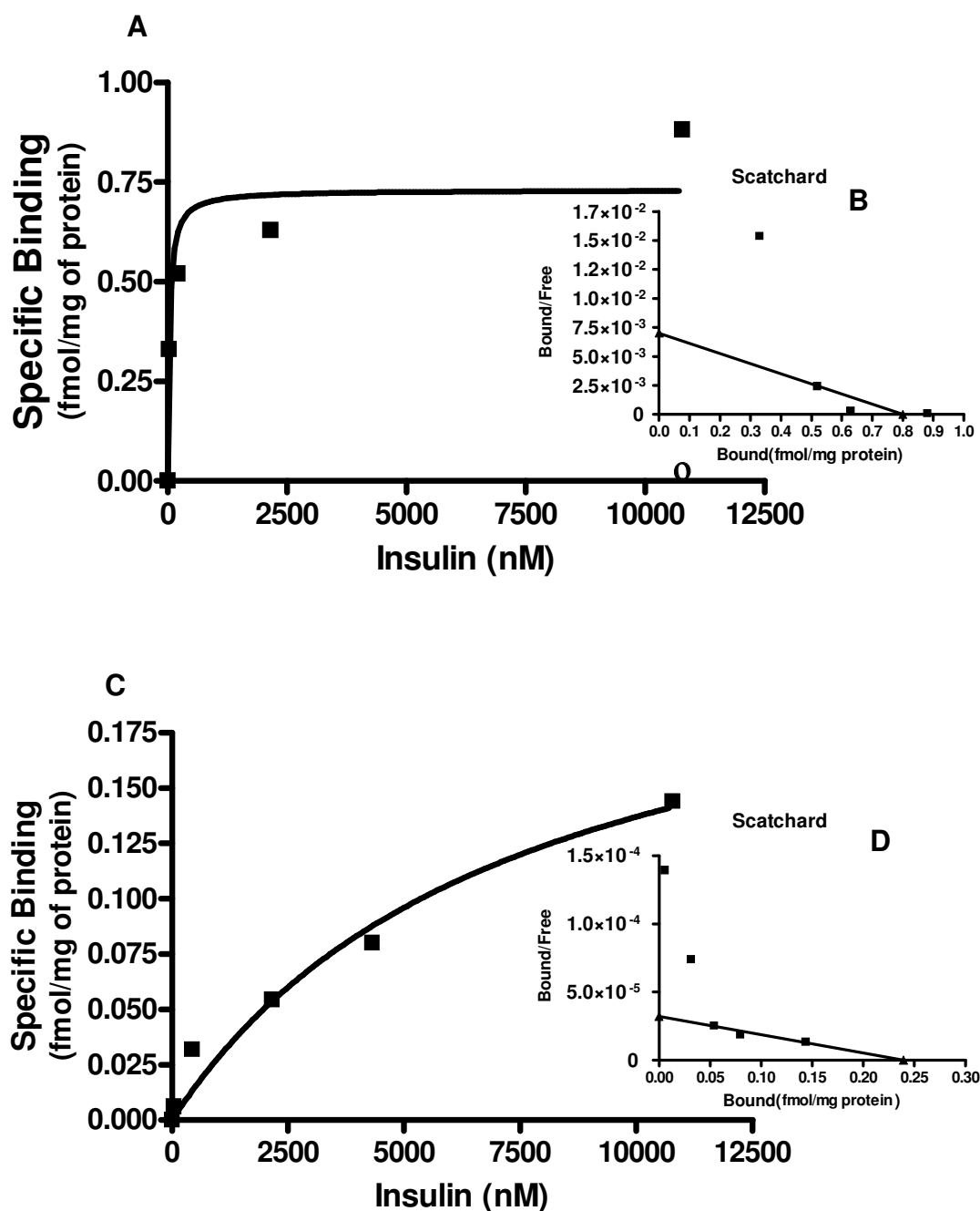


Fig 2. Binding of ^{125}I -insulin to posterior gills membranes. **A-** ^{125}I – insulin binding saturably to gills membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in control group (CG). No competition was observed using angiotensin I (o); **B-** Scatchard plot analysis of the saturation data of CG; **C-** ^{125}I – insulin binding saturably to gill membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in hyperosmotic group (HG); **D-** Scatchard plot analysis of the saturation data of HG.

The ^{125}I – insulin binding saturably and scatchard plot results are representative of 3 experiments in duplicate.

Table 1. Insulin binding receptors in posterior gill membranes of control group (CG) and 144h hyperosmotic stress (HG).

Groups	Ro (fmol / mg protein)	Kd (fmol)
CG	0.81 ± 0.18	1269 ± 1.14
HG	0.23 ± 0.06 ^a	10106 ± 1.79 ^b

Data are given as mean ± S.E.M. Results are representative of 3 samples from 10-15 crabs each. Ro, receptor concentration (binding capacity); Kd, affinity (dissociation constant). Superscript letters that differ across rows denote values significantly different from each other at $P < 0.05$.

a = significant difference of Ro as compared to the control group

b= significant difference of Kd as compared to the control group.

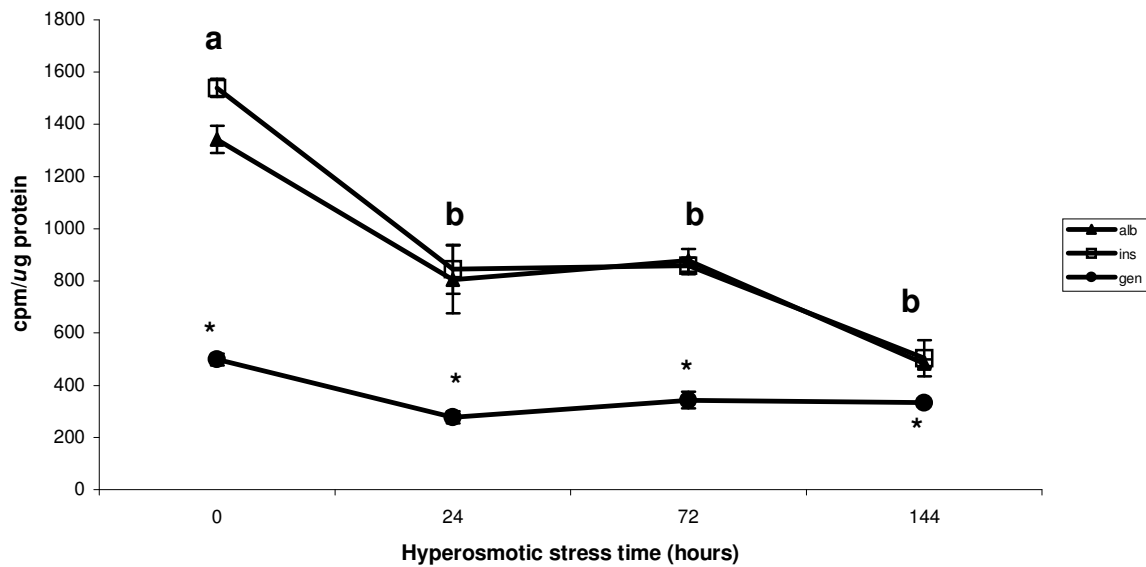


Fig 3. Phosphorylation of a substrate poly (Glu:Tyr 4:1) with (ins) or without (alb) bovine insulin and genistein (gen). The results are shown as cpm/ μ g of membrane protein.

a = significant difference in treatment with insulin as compared to treatment with albumin.

b = significant difference as compared to the control insulin group.

* The membranes treated with genistein showed a reduction in the phosphorylation as compared to the insulin group in all treatments.

N= 3 – 6 samples from 10-15 crabs each. $P < 0.05$

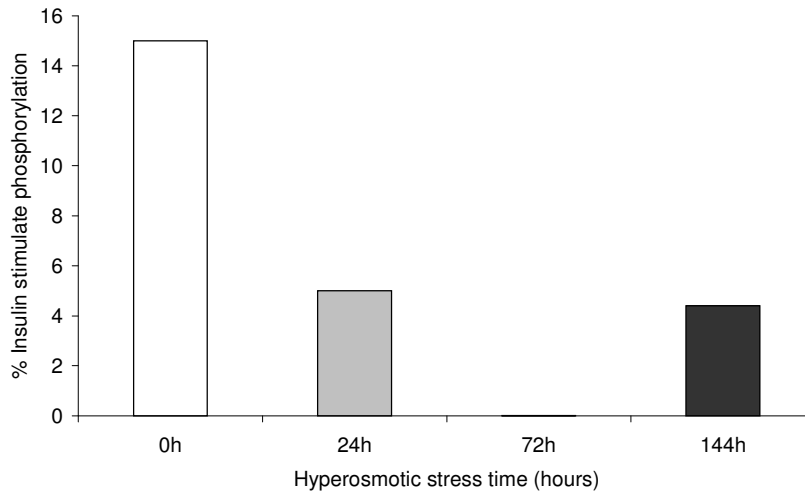
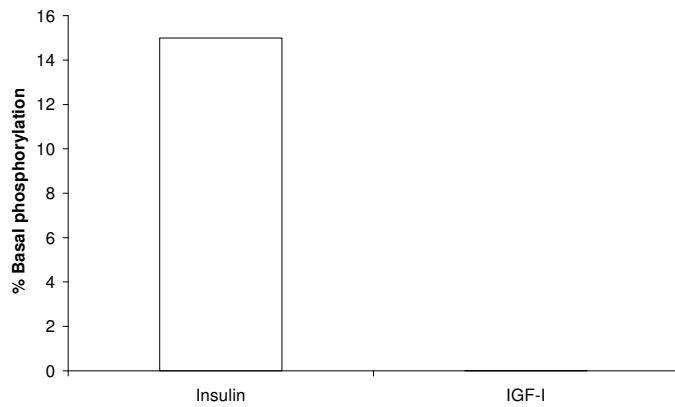
A**B**

Fig 4. Tyrosine kinase activity of the crab insulin receptor. **A-** Percentage of phosphorylation of synthetic substrate when the membranes were incubated with insulin compared to albumin at different times of osmotic stress. **B-** Percentage of stimulation of the synthetic substrate phosphorylation when the membranes were incubated with insulin or IGF-I.

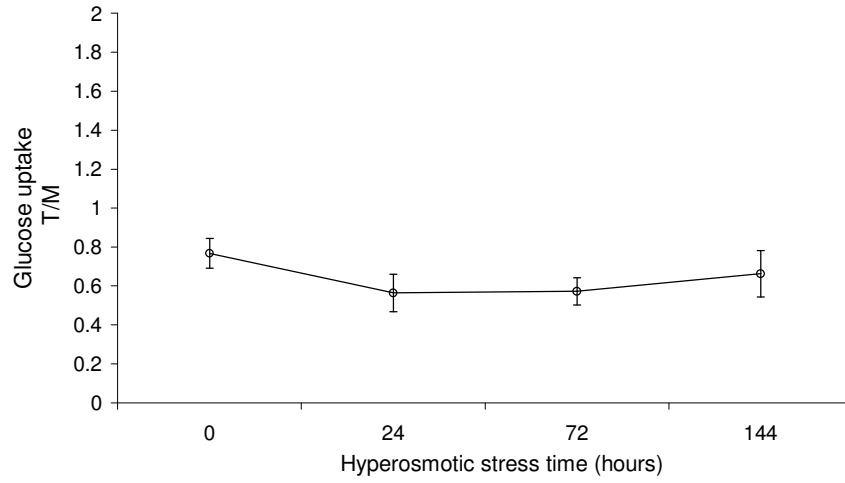


Fig. 5. Effect of hyperosmotic stress on 2-deoxy-D-¹⁴C glucose uptake in posterior gills. Data are given as mean ± S.E.M., *N*= 5-8 animals.

CAPÍTULO 2

Effect of hypo-osmotic condition on insulin receptor characteristics on the posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulata*

Autores: Márcia Trapp, Alan Pöppl, Edison Capp, Maria Flávia Ribeiro, Luiz Carlos Kucharski, Roselis S. M. Da Silva

Periódico: Journal Experimental Zoology

Artigo submetido, Agosto 2005

**Effect of hypo-osmotic condition on insulin receptor characteristics on the
posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulata***

Márcia Trapp , Alan Pöppel, Edison Capp, Maria Flávia Ribeiro, Luiz Carlos Kucharski,
Roselis S. M. Da Silva*

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, RS, Brazil

4. total number of figures = 4

total number of graphs in the figures = 7

total number of tables = 1...

5. Abbreviated title: Hypo-osmotic stress and insulin-like receptor

6. Correspondence to:*

Dr. Roselis S.M. da Silva
Departamento de Fisiologia – ICBS- UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500
90050-170 Porto Alegre – RS- Brazil
fax: +55 51 33163623
e-mail: Roselis@ufrgs.br

7. Grant sponsor: CNPq, grant number:

FAPERGS, grant number:

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the effects of hypo-osmotic stress on the characteristics and tyrosine kinase activity of the *Chasmagnathus granulata* insulin receptor-like tyrosine kinases (CGIRLTK) and on glucose uptake in the posterior gills of this crab. Insulin-binding sites were characterized in plasma membranes of the posterior gills of animals submitted to 24h of hypo-osmotic stress, through studies of binding with ^{125}I -insulin. Tyrosine kinase activity was determined by the insulin receptor capacity to phosphorylate the poly (Glu; Tyr 4:1) synthetic substrate in the presence of bovine insulin ($2 \times 10^{-7}\text{M}$). The uptake of [^{14}C] 2-deoxy-D-glucose in the gill tissue was also evaluated. No change was observed in the concentration of insulin receptors in the posterior gills after 24h of hypo-osmotic stress. However, a reduction in the affinity of these for bovine insulin was observed. Insulin receptor phosphorylation diminished after 24h of stress and returned to baseline values after 144h. Glucose uptake capacity, on the other hand, was not modified as a function of changes in the osmotic environment. The results suggest that hypo-osmotic stress modified the CGIRLTK characteristics in *C.granulata* gills in a time-dependent form. These changes are part of the adjustments needed for survival at low salinity levels. Further studies investigating other steps in the chain signaling insulin in animals exposed to stress will be needed to explain the functional relations of these modifications.

Key words: crab gills; glucose uptake; hypo-osmotic stress; insulin binding; crab insulin-related receptor; tyrosine kinase

INTRODUCTION

The ability to survive in an aquatic medium with fluctuating salinity is an essential requirement for successful colonization of this habitat (Gilles, '82). Organisms that live in estuarine areas constantly face salinity variation, and the cells tolerate volume alterations and, consequently, changes in the organic and inorganic composition of body fluids, as well as in energy reserves. These variations allow animals to make compensatory homeostatic adjustments (Kasschau et al., '84; Matsushima and Yamada, '92; Bishop and Burton, '93; Okuma and Abe, '94; Pillet et al., '95).

The intertidal estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, lives in the mesolittoral and supralittoral zones of estuaries widely distributed along the southern Brazilian coast, where salinity ranges from 0.22‰ to 34‰ (Botto and Irigoyen, '80; Turcato, '90). Previous studies by Bromberg ('92) indicate that *C. granulata* is a strong ionic hyper and hypo-regulator, presents hypo-osmotic hemolymph in concentrated media and hyperosmotic hemolymph in diluted media, with an isosmotic point in external media between 28.5‰ and 30‰ in winter and summer, respectively.

There is general agreement on the key role played by crab posterior gills in the osmoregulating activity of euryhaline crustaceans (Chausson and Regnault, '95; Péqueux and Gilles, '84). Studies on the physiological responses of the *C. granulata* gill tissue during the process of becoming acclimated to hypo-osmotic stress showed changes in the carbohydrate and lipid metabolism (Chittó et al., '01;

Luvizotto-Santos et al '03), increased activity of the Na^+/K^+ -ATPase enzyme in the posterior gills (Castilho et al., '01). Moreover, modifications in the morphology of the posterior gills, with increased thickness of the epithelium related to changes in ion transport were observed by Genovese et al. ('00).

Cell swelling has proved to be an important initiator of proliferative and metabolic changes in several cells (Kim et al., '01). A stressful environment could also modify the transduction signal of several hormones such as insulin, IGF-I and GH (Gual et al., '03a; McCormick, '01).

Insulin in vertebrates is a hormone with anabolic action, promoting glycogen, protein and lipid synthesis. Furthermore, in several cells, insulin as well as the insulin-related growth factors (IGFs) stimulate ion transport by activating the Na^+/H^+ , Na-K-2Cl e Na^+/K^+ -ATPase transporters, whose action leads to an accumulation of intracellular potassium. All these effects of insulin on mammals lead to an increased cell volume (Häussinger et al., '94; Lang et al., '98).

Both insulin and the hypo-osmotic stress cause an increase cell volume. However, there are few studies relating the effects of hypo-osmotic stress to the insulin signal in vertebrates (Saltiel and Kanh, '01; Chiri et al. '04).

Despite the classical functions of insulin in mammals, it is believed that insulin or insulin-like substances present less specific functions in invertebrates, showing involvement with growth regulation, differentiation, metabolism, reproduction and osmoregulation (Epple and Brinn, '87; Chan and Steiner, '00; Porte Jr. et al., '05)

Several studies showed the existence of insulin-like peptides in invertebrates (Ishisaki et al., '83; Lagueux et al., '90; Smit et al., '98; Floyd et al., '99; Gregoire et al., '00; Kawano et al., '00; Brogiolo et al., '01; Gallardo et al., '03), and insulin-

related receptors were characterized in several insect species (Fernandez-Almonacid and Rosen, '87; Nishida et al., '86; Petruzelli et al., '86; Fullbright et al., '97; Graf et al., '97), mollusks (Roovers et al., '95; Jonas et al., '96; Lardans et al., '01; Gricourt et al., '03); nematodes (Kimura et al., '97), in sponges (Schäcke et al. '94; Skorokhod et al. '99) and in cnidarians (Steele et al. '96).

In the *Homarus americanus* lobster, insulin-like substances were isolated from the hepatopancreas (Sanders, '83a; Gallardo, '03). Moreover, Chuang and Wang ('94) demonstrated that mammalian insulin stimulates auto-phosphorylation of insulin-like receptors in the muscle of shrimp.

In the *C. granulata* crab insulin receptors were identified in different tissues and the gills were the tissue with the highest binding values. Bovine insulin stimulated the tyrosine kinase activity in the insulin receptor β -subunit from gills (Kucharski et al., '99). Moreover, mammalian insulin was able to stimulate glucose uptake and glycogen synthesis in the posterior gills of this crab (Kucharski et al., '02).

The tyrosine kinase region of the *Chasmagnathus granulata* insulin receptor-like tyrosine kinase (CGIRLTK) was cloned (DG104241) and partially sequenced in the gills of *C. granulata*. The tyrosine kinase region showed a high homology to the tyrosine kinase regions of other invertebrates and vertebrates (Trapp et al., '02).

In order to obtain further information about insulin participation during acclimation to hypo-osmotic conditions in crustaceans, the aim of the present study was to investigate the effects of hypo-osmotic stress on the CGIRLTK

concentration and affinity to insulin, on the tyrosine kinase activity and on the glucose uptake in the posterior gills of *Chasmagnathus granulata*.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedure

Male *Chasmagnathus granulata* crabs in stage C of intermoult cycle (Drach and Tchernigovtzeff, '67) were collected from Tramandaí Lagoon, RS, Brazil. Their body weight ranged from 15 g to 17g. In the laboratory, the animals were acclimated in aquaria containing fresh running water at a salinity of 20‰, temperature of 25° C and nature light/dark cycle. The crabs received meat *ad libitum* once a day for 2 weeks (control group - CG). After the acclimation period, the animals were put into an aquarium containing water at a salinity of 0 ‰, under the same conditions described before, for 24, 72 or 144h (hypo-osmotic stress groups - HG).

Gill Membrane Preparation

The gill membrane preparation was performed according to Kucharski et al. ('99) with some modification. For each bulk preparation, 10 -15 animals were anesthetized by chilling (10 min) and posterior gills were carefully removed, weighed, and rinsed several times in ice-cold buffer. The gills were homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer with a Teflon pestle in ice-cold buffer (1:10, w/v) containing 0.3 M sucrose, 10 mM Hepes, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 13 mM EDTA, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 3,000xg

for 5 min at 4° C to separate membranes from nuclei and cell debris. The supernatant was centrifuged at 30,000xg for 20 min at 4° C. The resultant pellet, resuspended with a Dounce-type homogenizer (Kontes Glass Co., Vineland, NJ) in Tris-HCl buffer (50mmol/l, pH 7.4), represents the crude membranes. This suspension was kept at -20° C until use. The protein concentration was determined by Bradford's method ('76) of using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Insulin-binding assay

The insulin binding assays were performed according to Párrizas et al. ('94) modified for crustaceans. The gill membrane suspensions (0.4 - 0.5 mg protein) from crabs in a control group (0h) and exposed to 24h of hypo-osmotic stress were incubated in buffer containing 10mM HEPES, 300mM NaCl, 1mM PMSF and 1% BSA (pH 7.4), with an increasing concentration of unlabeled bovine insulin (0-10µM) (bovine insulin was supply by Biobrás®), and the radiolabeled insulin as tracer (50,000 counts/min of human Tyr^{A14-125}I-monoiodoinsulin, 2,000 Ci/mmol specific activity, Amersham Bioscience) in a total volume of 0.2 ml. After incubation for 120 min at 25° C (Kucharski et al., '97), the ¹²⁵I-insulin was separated from the incubation medium by filtration through a glass microfiber filter (Whatman GF/B, Maidstone, UK). The filter was rinsed with 10ml ice cold incubation buffer with 0.1% BSA and the radioactivity retained was counted with a gamma counter (LKB). The radioactivity absorbed by the microfiber filter in the absence of membrane was less than 0.2% of the total counts. Additional studies were carried out using ¹²⁵I-insulin in the presence or absence of angiotensin-I human (250 µg/ml).

Substrate phosphorylation

The gill membrane suspensions (40 µg of the protein) were incubated with 2×10^{-7} M BSA, 2×10^{-7} M insulin alone or pre-incubated with genistein 500 µM plus 2×10^{-7} M of bovine insulin, for 30 min at 25° C, and incubated with 0.5 µCi of [γ ³²P] ATP (300mCi/nmol, Amersham) together with unlabeled ATP (5 µM) in a total volume of 45 µl of buffer containing 25 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, and 1 mM sodium orthovanadate, for 10 min at 25° C. Subsequently, 1 mM poly (Glu: Tyr 4:1) was added for 1hr at 25° C. The reaction was stopped by application of the sample on phosphocellulose paper (Aronowski et al., '92). The filter was rinsed once with 10% TCA and 3 times with 75 mM H₃PO₄. The incorporated ³²P was measured with scintillation liquid in the LKB counter.

[¹⁴C] 2-Deoxy - D – glucose Uptake

For this experiment, the gills were removed, chitin cuticle was cut up and the tissue samples (70mg) were immediately washed in buffer. The gills from crab were washed in buffer containing 300mM NaCl, 12.2 mM KCl, 11 mM CaCl₂, 93 mM MgCl₂.H₂O, 31mM NaHCO₃, 278mM Na₂SO₄ and 5.8 mM NaBr, plus 10mM Hepes and 0.1 mM PMSF, pH 7.8, equilibrated with 5% CO₂:95% O₂. The hemolymph osmolality at 0‰ salinity was 636 ± 18.01 mOsm/kg (n=10) and in control crabs (20‰) it was 719 ± 10.41 mOsm/kg (n=10).

The gills of crabs were incubated (120 min) (Kucharski et al., '02) in 500 µl of respective incubation buffer plus 0.2 µCi 1-[¹⁴C] 2-deoxy-d-glucose ([¹⁴C] DG – 39mCi/mmol; Amersham Biosciences).

Following incubation, the gills were rinsed in cold incubation buffer and blotted with filter paper, respectively. The [^{14}C] DG uptake was immediately determined by measuring the extracellular (incubation medium) and intracellular radioactivity (Kucharski et al., '02). Results are expressed as tissue/medium (T/M) rate, i.e., cpm/ml tissue fluid divided by cpm/ml incubation medium.

Statistical analysis

Data were analyzed by one-way or two-way ANOVA, while differences between the experimental conditions to which the two groups were submitted were analyzed by one-way ANOVA; post hoc tests were carried out using SNK's test. $P < 0.05$ was taken as the level of significance. Binding data were analyzed by Scatchard ('49) plot and were performed with Prism 4 Software. Student's t-test was used to compare insulin receptor characteristics. Data are shown as means \pm SEM. All test were performed with the Jandel SigmaStat, version 2.0.

RESULTS

Figure 1 shows the phosphorylation of the synthetic substrate of poly (Glu: Tyr 4:1) in gill membrane preparations of animals submitted to hypo-osmotic stress. At time zero (control), bovine insulin significantly ($P < 0.05$) stimulated the phosphorylation of the synthetic substrate in posterior gills (Figure 1A). In the 24 and 72h stress periods, a significant ($P < 0.05$) reduction of substrate phosphorylation occurred, and the insulin no longer stimulated receptor phosphorylation during these times. In a 144h period, the phosphorylation values

returned to the control levels and bovine insulin stimulated the phosphorylation of the receptor more effectively ($P<0.05$) than in the control.

Figure 1B represents the percentage of genistein inhibition compared to the phosphorylation of the synthetic substrate of the membrane incubated with bovine insulin. The significant inhibition ($P<0.05$) of the phosphorylation of insulin receptors in the posterior gills was observed at all stress times studied.

The results in figure 2A shows that the specific binding in CG was saturable at low unlabeled insulin concentration. However the figure 2C shows that the specific binding in HG was proportional to unlabelled insulin concentration. Saturability of insulin produced a linear Scatchard plot (Figure 2B and D). The resolution of this curve established no significant ($P>0.05$) differences between the control and stress groups as to concentration of receptors, although, the hypo-osmotic stress increased the concentration of receptors by 80%. However, the receptor affinity to the hormone was lower ($P<0.05$) in the animals submitted to stress than in control group (Table 1). The angiotensin I was not able to prevent the ^{125}I -insulin uptake by posterior gills membranes in CG.

Figure 4 shows data on the uptake of [^{14}C] DG in the posterior gills of *C. granulata* at different times of hypo-osmotic stress. No significant ($P>0.05$) differences were observed between glucose uptakes at different stress times.

DISCUSSION

Studies have shown that the transduction of the insulin signal appears to have been maintained from the invertebrates to the mammals (Chan and Steiner,

'00; Claeys et al., '02). In this study, increased tyrosine kinase activity was observed in the control animals when the posterior gill membranes were incubated with bovine insulin. These results agree with previous studies that showed that the gill tissue presents tyrosine kinase activity and autophosphorylation capacity after incubation with mammalian insulin (Kucharski et al., '99).

Since insulin-like peptides have not been isolated in crabs so far, bovine insulin was employed because experimental data have demonstrated that mammalian insulin stimulates glucose uptake and glycogenesis in crustaceans (Kucharski et al., '02; Sanders, '83b; Hager and Bittar, '85).

Several stressing agents, such as changes in salinity, genotoxic agents, ultraviolet light modify the transduction of the insulin signal in the cells and may diminish or increase the signaling (Gual et al., '03a,b; Ouwens et al., '01). In the crabs exposed to the hypo-osmotic environment, phosphorylation of exogenous substrate diminished after 24h and 72h of stress in control and insulin-treated groups. Furthermore, the insulin was no longer able to stimulate the exogenous substrate phosphorylation during these times, probably due to the diminished affinity of the insulin to receptors. The lag phase of about 72h of the insulin resistance during the hypo-osmotic stress may be seen as a consequence of the stimulation of cellular osmosensors, through changes in intracellular ion and metabolite concentration, and cytoskeletal modifications (Kültz and Burg, '98). Moreover, both the insulin and the hypo-osmotic stress cause increased cell volume and anabolism. As a form of cell protection during the first phase of osmotic adjustment, there would be a reduction of insulin receptors concentration

and affinity, thus preventing a superposal of the effects on the swelling and metabolism.

In mammals there are several proteins that are activated by both insulin and hypo-osmotic stress, such as P13-K, MAP kinases and Jun-NH₂-terminal kinase (JNK), or kinases regulated by extracellular signals (ERK-1 and 2) (Lang et al., '98; Kim et al., '01). In the gills of the euryhaline teleostean, *Fundulus heteroclitus* there is increased activity of several MAP kinases in response to hypo-osmotic stress. This increase begins after 1 hr of stress and is kept up for 4 weeks (Kültz and Avila, '01). In A6 renal epithelial cells of amphibians, the hypo-osmotic stress activates the ERKs within minutes (Chiri et al., '04). Although there is no data in the literature relating insulin and acclimation to hypo-osmotic stress in invertebrates, the participation of neuroendocrine factors in osmoregulation has already been demonstrated in crustaceans (Freire et al., '95).

A decrease in the insulin receptor concentration, affinity and tyrosine kinase activity during 72h could favor the first step of hypo-osmotic acclimation. However, at 144h of hypo-osmotic stress the exogenous substrate phosphorylation increases and insulin was able to stimulate the receptor phosphorylation again. In general, cell swelling supports an anabolic situation (Schliess and Häussinger, '02). In crustaceans the anabolic effects of insulin on the carbohydrate metabolism were verified in lobster and crab muscle, and in posterior gills of *C. granulata* (Richardson et al., '97; Welcomme and Devos, '94; Kucharski et al., '02). An increase in insulin stimulated receptor tyrosine kinase activity at 144h could increase the metabolic anabolism via protein synthesis, thus, decreasing the intracellular osmolytes, such as the amino acids. This may be seen a co-ordination

of hormonal process in response to changes of cellular volume with different homeostatic mechanisms according to the length of time that the animals were exposed to hypo-osmotic stress.

Bovine insulin was effective to displace the ^{125}I -insulin bound to gill membrane, and an unrelated hormone such as angiotensin I did not compete with labeled insulin. The osmotic stress increase the unlabeled insulin necessary to saturate the insulin receptor what could be explain for the increase dissociation in consequence of the low affinity. In addition the linear Scatchard plot of the saturation of unlabeled insulin reveals the presence of only one binding site with similar receptor concentration such as in CG group.

During hypo-osmotic stress several metabolic and enzyme activity modifications had already being identified in the posterior gills of *C. granulata* (Kucharski et al., '02; Castilho et al., '01; Halperin et al., '04). It was demonstrated that the activity of enzyme $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ is increased in the posterior gills of crab acclimated to 30 days of hypo-osmotic stress (Castilho et al., '01), and that neuroendocrine factors such as dopamine may regulate the activity of this enzyme during this type of stress (Halperin et al., '04). The administration of mammalian insulin for 8 days in the crab increased the activity of this enzyme in the posterior gills of *C. granulata*. The increase observed in the signaling of insulin at 144 h of hypo-osmotic stress corroborates these data, since the increased activity of this enzyme is important for homeostatic adjustments to stress.

After 24h of hypo-osmotic stress there is a diminished concentration of free glucose, accompanied by reduced gluconeogenesis from aminoacids at 72h of stress, but the glycogen concentrations were not modified during this period (Chittó

et al., '01). In this study, it was demonstrated that this reduction of glucose content in the gills does not occur because of the decrease of glucose uptake, since this is not altered during the hypo-osmotic stress. Moreover, it is believed that lipids are the main source of glucose production in the gills during acclimation to osmotic stress in *C. granulata* (Chittó et al., '01; Luvizotto-Santos et al. '03).

Most of the investigations on osmotic regulation in mammals are performed on *in vitro* cells and not on a living organism (Kültz and Ávila, '01). In this context, *Chasmagnathus granulata* is an interesting model to investigate the molecular adaptations to salinity changes, since its gill cells are in direct contact with the environment in which constant osmotic variations may occur. According to Warren and Pierce ('01), the cell responses to osmotic stress are independent of the phylogeny and are under the influence of the osmotic environment in which the cells are. Thus, the stress-caused variations in the transduction of the insulin signal observed in the posterior gills of *C. granulata* may not be limited to this species.

This study demonstrated that hypo-osmotic stress induces modifications in the characteristics of the insulin-receptors in the posterior gills, causing reduction in affinity and tyrosine kinase activity of these receptors and a state of insulin-resistance in the shorter stress times, and increasing the insulin stimulated tyrosine kinase activity in longer stress times.

ACKNOWLEDGEMENTS

R.S.M.S and E.C. are recipients of fellowships and M.T and A.P received scholarships from CNPq. The experiments were performed in compliance with the

current Brazilian laws. The authors wish to thank Biobrás for donating the bovine insulin.

LITERATURE CITED

Aronowski, J; Giotta, JC; Waxham, MN 1992. Ischemia induced translocation of Ca^{+2} / calmodulin dependent protein kinase II potential role in neural damage. *J Neurochem* 58: 1743-1753.

Bishop, SH and Burton, RS. 1993. Amino acid synthesis during hyposmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. *Comp Biochem Physiol* 106A (1): 49-56.

Botto, JL and Irigoyen, HP. 1980. Bioecologia de la comunidad del cangrejal I contribucion al conocimiento biologico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. *Sem Latinoam Ecol Bentonica y Sedimentol Plataf Cont Atlant Sur, UNESCO-Montevideo* 1: 161-169.

Bradford, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brogio, W.; Stocker, H.; Ikeya, T.; Rintelen, F.; Fernandez, R.; Hafen, E. 2001. An evolutionary conserved function of the *Drosophila* insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11: 213-221.

Bromberg, E. 1992. Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper osmótico no inverno e no verão. Tese (Doutorado em Oceanologia Biológica)-Instituto de Ciências. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Castilho, PC, Martins, IA, Bianchini, A. 2001. Gill Na^{+} , K^{+} - ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 256: 215-227.

Chan, SJ; E Steiner, DF. 2000. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Amer Zool* 40: 213-222.

Chausson, F and Regnault, M. 1995. Teneur en glycogène des branchies de *Carcinus maenas* (Crustacé, Décapode), comparaison entre branchies antérieures et postérieures. *Cah. Biol Mar* 36: 291-297.

Chiri, S; Bogliolo, S; Ehrenfeld, J; Ciapa, B. 2004. Action of extracellular signal-regulated kinase ERK after hypo-osmotic stress in renal epithelial A6 cells. *Biochem Biophys Acta* 1664: 224-229.

Chittó, A.L., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e o efeito do ácido picolínico sobre a gliconeogênese em brânquias de caranguejo *Chasmagnathus granulata*. XVI Reunião Anual da

Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brazil, Abstract p.416.

Chuang, N-N. and Wang, P-C. 1994 Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Physiol* 108: 289-297.

Claeys, I; Simonet, G; Poels, J; Van Loy, T; Vercammen, L; De Loof, A; Vanden Broeck, J. 2002. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides* 23: 807-816.

Drach, F and Tchernigovtzeff, C. 1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie Milieu* 161: 595-607.

Epple, A and Brinn, JE. 1987. The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets. In: DS Farner (coord ed) *Zoophysiology* 21: 9-122.

Fernandez-Almonacid, R and Rosen, OM. 1987. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Mol Cell Biol* 7(8): 2718-2727.

Floyd, Pd.; Li, L.; Rubakhin, Ss.; Swedler, Jv.; Horn, Cc.; Kupfermann, I. Alexeeva, Vy.; Ellis, Ta.; Dembrow, Nc.; Weiss, Kr.; Vilim, Fs. 1999. Insulin prohormone processing, distribution and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *J Neurosci* 19(18): 7732-7741.

Freire, CA; Mcnamara, JC; Rosa, JC; Greenes, LJ. 1995. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): free amino acid concentrations in the hemolymph. *Gen Comp Endoc* 100: 83-91.

Fullbright, G; Lacy, ER; Bullesbach, EE. 1997. The prothoracicotropic hormone bombyxin has specific receptors on insect ovarian cells. *European Journal of Biochemistry* 245(3): 774-780.

Gallardo, N., Carrillo, O., Moltó, E., Deás, M., González-Suárez, R., Carrascosa, J.M., Ros, M., Andrés, A, 2003. Isolation and biological characterization of a 6-kDa protein from hepatopâncreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *Gen Comp Endocrinol* 131: 284-290.

Genovese, G; Luquet, CM; Paz, DA; Rosa, GA; Pellerano, GN. 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper-and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. *J Anat* 197: 239-246.

Gilles, R. 1982. Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. *Bol Fisiol Animal USP* 6: 1-36.

Graf, R.; Neuenschwander, S.; Brown, M.R.; Ackermann, U. 1997. Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homolog from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*. *Insect Molec Biol* 6: 151-163.

- Gregoire, Fm.; Chomiki, N.; Kachinskas, D.; Warden, Ch. 2000. Cloning and developmental regulation of a novel member of the insulin-like gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 385-390.
- Gricourt, L.; Bonnac, G.; Boujard, M.; Kellner, K. 2003. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrlGF-I effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol* 134: 44-56.
- Gual, P.; Gonzalez, T.; Grémeaux, T.; Barrés, R.; Marchand-Brustel, Y.; Tanti, J.F. 2003a. Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3t3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 278(29): 26550-26557.
- Gual, P; Marchand-Brustel, Y; Tanti, JF. 2003b. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Diabetes Metab* 29: 566-575.
- Hager Sr, Bittar EE. 1985. Hormones and the barnacle muscle-fiber as a preparation. *Comp Biochem Physiol C-Pharmacol Tox Endocrinol* 81 (2): 247-252.
- Halperin J, Genovese G, Tresguerres M, Luquet CM. 2004. Modulation of ion uptake across posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* by dopamine and Camp. *Comp Biochem Physiol-Mol Physiol* 139(1): 103-109.
- Häussinger, D; Lang, F; Gerok, W. 1994. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am J Physiol* 267: E343-E355.
- Ishizaki, H.; Suzuki, A.; Morya, I.; Mizoguchi, A.; Fujishita, M.; Ooka, H.; Kataoka, H.; Isogai, A.; Nagasawa, H. 1983. Prothoracicotrophic hormone bioassay pupal adult *Bombyx* assay (Prothoracicotrophic hormone -PTTH- *Bombyx mori* *Samia-Cynthia ricini* pupal assay). *Dev Growth Differ* 25: 593-600.
- Jonas, E.A.; Knox, R.J.; Kaczmarek, L.K.; Schwartz, J.H.; Solomon, D.H. 1996. Insulin receptor in *Aplysia* neurons: characterization, molecular cloning, and modulation of ions currents. *J Neurosci* 16: 1645-1658.
- Kasschau, MR, Skisak, CM; Cook, JP; Mills, WR. 1984. β -Alanine metabolism and high salinity stress en the sea anemone, *Bunodosoma canernata*. *J Comp Physiol* 154B: 181-186.
- Kawano, T.; Ito, Y.; Ishiguro, M.; Takuwa, K.; Nakajima, T.; Kimura, Y. 2000. Molecular cloning and characterization of a new insulin / IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 273(2): 431-436.
- Kim, RD; Stein, GS; Chari, RS. 2001. Impact of cell swelling on proliferative signal transduction in the liver. *J Cell Biochem* 83: 560-569.
- Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. 1997. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. 277: 942-946.
- Kucharski LC, Schein V, Capp E, Da Silva RSM. 2002. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen Comp Endocrinol* 125: 256-263.

Kucharski, LC, Ribeiro, MF, Schein, V, Da Silva, RSM, Marques, M. 1997. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *J Exp Zool* 279: 118-125.

Kucharski, LC; Capp, E, Chittó, ALF; Trapp, M; Marques, M; Da Silva, RSM. 1999. Insulin signaling: tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. *J Exp Zool* 283: 91-94.

Kültz D, Burg M. 1998. Evolution of osmotic stress signaling via map kinase cascades. *J Exp Biol* 201 (22): 3015-3021.

Kültz, D. and Avila, K. 2001. Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp Biochem Physiol Part B* 129: 821-829.

Lagueux, M.; Lwoff, L.; Meister, M.; Goltzene, F.; Hoffmann, J.A. 1990. cDNAs from neurosecretory-cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur J Biochem* 187: 249-254.

Lang, F; Busch, GL; Ritter, M; Völkl, H; Waldegger, S; Gulbins, E; Häussinger, D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews* 78: 247-273.

Lardans, V.; Coppin, J.F.; Vicogne, J.; Aroca, E.; Delcroix, M; Dissous, C. 2001. Characterization of a insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Biochim Biophys Acta* 1510: 321-329.

Luvizotto-Santos R, Lee JT, Branco ZP, Bianchini A, Nery LEM Luvizotto-Santos. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J Exp Zool A-Comp Exp Biol* 295A (2): 200-205.

Matsushima, O and Yamada, A. 1992. Uptake of L and D-alanine by a brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, with special reference to their transport pathways and the salinity effect. *J. Exp. Zool* 263: 8-17.

McCormick, SD. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Amer. Zool* 41: 781-794.

Nishida, Y.; Hata, M.; Nishizuka, Y.; Rutter, W.J.; Ebina, Y. 1986. Cloning of a *Drosophila* cDNA encoding a polypeptide similar to the human insulin receptor precursor. *Biochem Biophys Res Commun* 141(2) 474-481.

Okuma, E and Abe, H. 1994. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. *Comp Biochem Physiol* 109A (1): 191-197.

Ouwens, D.M.; Mesquita, D.S.G.; Dekker, J.; Maassen, J.A. 2001. Hyperosmotic stress activates the insulin receptor in CHO cells. *Bioch. Bioph. Acta* 1540: 97-106.

Párrizas, M, Planas, J, Plisetskaya, EM, Gutiérrez, J. 1994. Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am J Physiol* 266: 1944-1950.

Péqueux, A and Gilles, R. 1984. Control of extracellular fluid osmolality in crustaceans. In: Péqueux, A; Gilles, R; Bolis, L, editors. Osmoregulation in estuarine and marine animals. Proc 5th Conf. Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem. Taormina, Italy pp 17-34. Lecture notes on Coastal and estuarine studies, vol.9. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.

Petruzzelli, L.; Herrera, R.; Arenas-Garcia, R.; Fernandez, R.; Birnbaum, M.J.; Rosen, O.M. . 1986. Isolation of a *Drosophila* genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated *Drosophila* receptor with an anti-peptide anti-body. Proc Nat Acad Sci 83: 4710-4714.

Pillet, SC; Henry, R; Doeller, JE; Krauss, DW. 1995. A comparison of the gill physiology of two euryaline crabs species, *Callinectes sapidus* e *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function as acclimation salinity. J Exp Zool 198 ; 349-359.

Porte Jr, D; Baskin, DG; Schwartz, MW. 2005. Insulin signaling in the central nervous system. Diabetes 54: 1264-1276.

Richardson, N.A.; Anderson, A.J.; Sara, V.R. 1997. The effects of insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). Gen Comp Endocrinol 105: 287-293.

Roovers, E.; Vincent, M.E.; Vankesteren, E.; Geraerts, W.P.M.; Planta, R.J.; Vreugdenhil, E.; Vanheerikhuizen, H. 1995. Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. Gene 162(2): 181-188.

Saltiel, AR and Kahn, CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 413: 799-806.

Sanders, B. 1983a. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. I. Insulin immunoreactivity. Gen Comp Endocrinol 50: 366-373.

Sanders, B. 1983b. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . II. Insulin-like biological activity. Gen Comp Endocrinol 50: 374-377.

Scatchard, G. 1949. The attraction of protein for small molecules and ions. Ann N Y Acad Sci 51: 660-667.

Schäcke, H.; Muller, W.E.G., Gamulin, V.; Rinkevich, B. The 1994. IG superfamily includes members from the lowest invertebrates to the highest vertebrates. Immunology Today 15(10), 497-498.

Schliess, F and Häussinger, D. 2002. The cellular hydration state: a critical determinant for celldeath and survival. Biol. Chem 383: 577-583.

Skorokhod A, Gamulin V, Gundacker D, Kavsan V, Muller Im, Muller Weg. 1999. Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. Biological Bulletin 197(2): 198-206.

Smit, A.B.; Vankesteren, R.E.; Li, K.W.; Vanminnen, J.; Spijker, S.; Vanheerikhuizen, H.; Geraerts, W.P.M. 1998. Towards understanding the role of

insulin in the brain: Lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Progress in Neurobiology* 54(1), 35-54.

Steele, R.E.; Lieu, P.; Mai, N.H.; Shenk, M.A.; Sarras, M.P. 1996. Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in Hydra. *Development Genes and Evolution* 206(4), 247-259.

Trapp, M, Schein, V, Wache, Y, Favrel, P, Capp, E, Kucharski, LC, Van Wormhoudt, A, Da Silva, RSM. 2002. Tyrosine kinase activity of the of the insulin receptor from *Chasmagnathus granulata* gills and partial cloning of insulin receptor gene. *Procced. 21st Conf Eur Comp Endocrinol* 1: 375-379.

Turcato, GO. 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Disserta (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia). Departamento de Zoologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Warren JW, Pierce SK. 2001. The CaM kinase II inhibitor KN-62 inhibit cell volume recovery from hypoosmotic stress. *FASEB J* 15 (4): A412-A412 Part 1.

Wellcomme, L and Devos, P. 1994. Immunological identification and biochemical characterization of glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas*. *J Exp Zool* 268: 218-223.

Figures and Legends

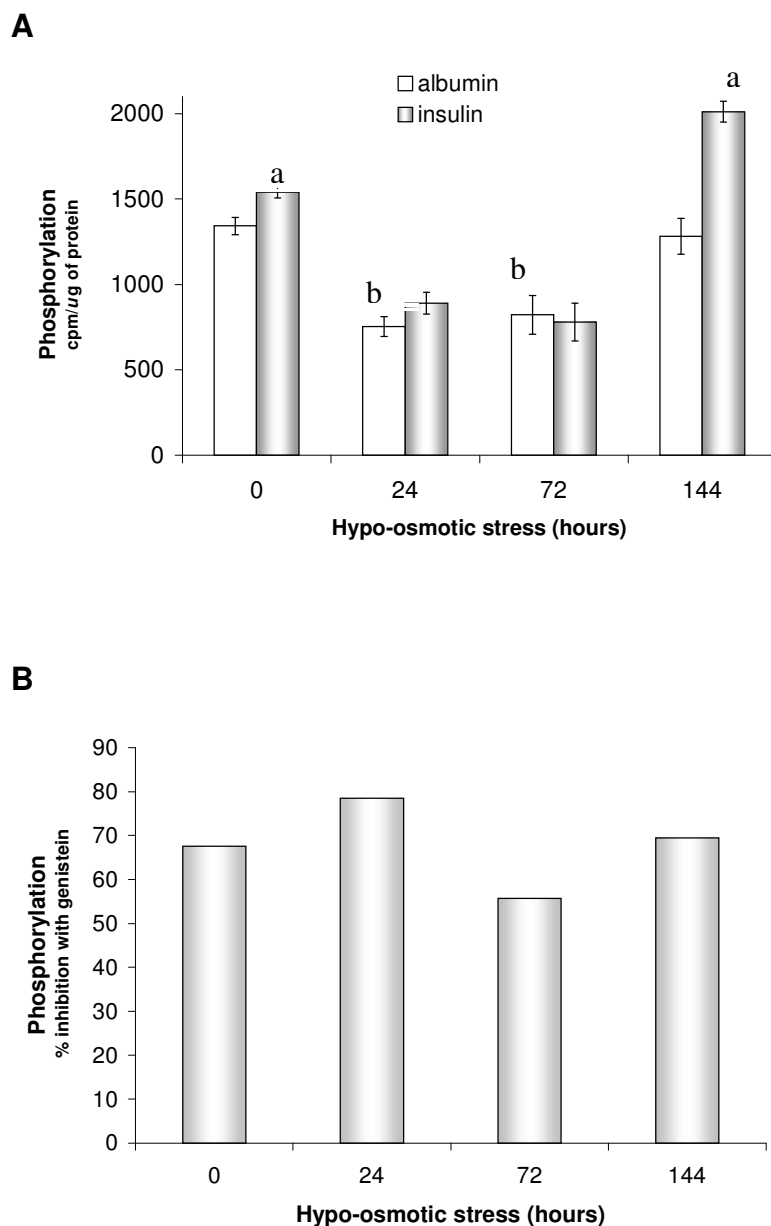


Fig 1. Phosphorylation of a substrate poly (Glu, Tyr 4:1) with 0.5 μCi of $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was measured with or without 2×10^{-7} M insulin and insulin plus 500 μM genistein. The results are shown as CPM/ μg of membrane protein. A) data concerning the phosphorylation of the crab insulin-related receptor (CGIRLTK) of posterior gills of *C. granulata* submitted to different times of hypo-osmotic stress.

B) Percentage of inhibition of the phosphorylation of the synthetic substrate when genistein was added to the incubation medium compared to incubation with insulin.

a = significant difference of phosphorylation in treatment with insulin compared to treatment with albumin.

b = significant difference compared to the control insulin group

N= 3 – 6 gill pools (10 to 15 animals in each) at each point. $P < 0.05$

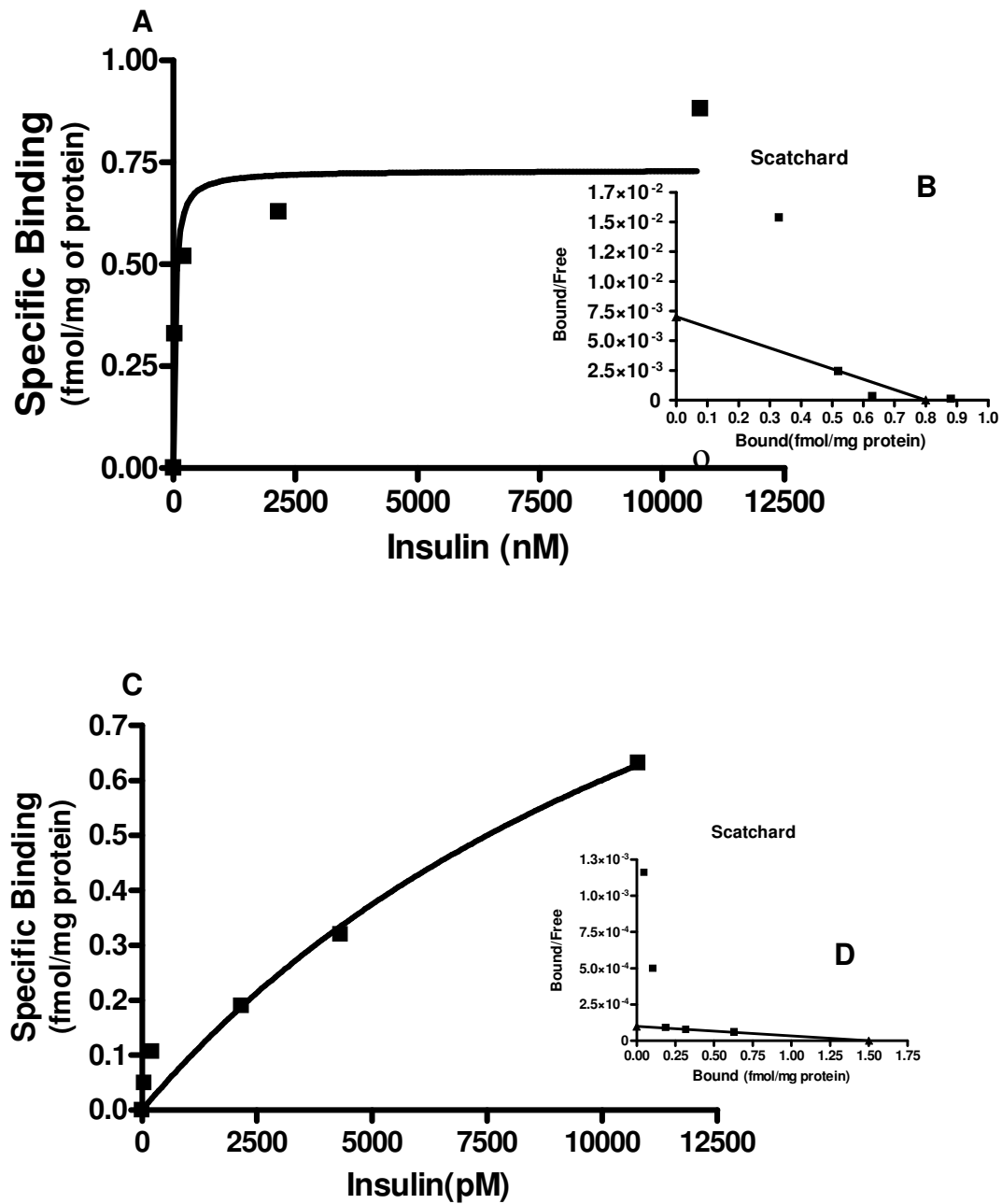


Fig 2. Binding of ¹²⁵I-insulin to posterior gills membranes. **A-** ¹²⁵I – insulin binding saturably to gill membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in control group (CG). No competition was observed using angiotensin I (o); **B-** Scatchard plot analysis of the saturation data of CG. **C-** ¹²⁵I – insulin binding saturably to gill membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in

hypo-osmotic group (HG); **D**- Scatchard plot analysis of the saturation data of HG. The ^{125}I – insulin binding saturably and scatchard plot results are representative of 3 experiments in duplicate.

Table.1. Characteristics of insulin- binding receptor in posterior gills of *Chasmagnathus granulata* crab submitted to 24h hypo-osmotic stress

Groups	Ro (fmol / mg protein)	Kd (fmol)
Control	0.81 ± 0.18	1269 ± 1.44
Hypo-osmotic	1.46 ± 0.43	14906 ± 2021*

Data are given as mean ± S.E.M. Results are representative of at least 3 experiments done with different microsomes membranes. Ro, receptor concentration (binding capacity) fmol/mg protein; Kd, affinity (dissociation constant). Superscript symbols that differ across rows denote values significantly different from each other at $P < 0.05$.

* significant difference of Kd as compared to the control group

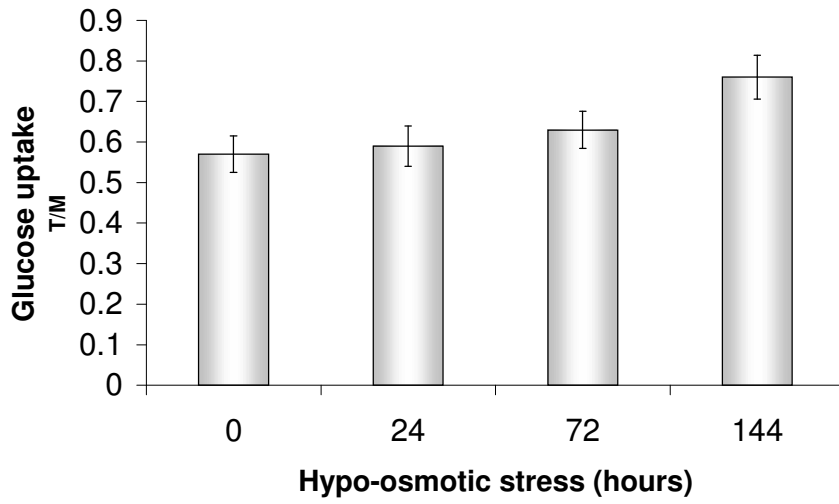


Fig 4. Effect of hypo-osmotic stress on 2-deoxy-D-¹⁴C glucose uptake in posterior gills. Data are given as mean ± S.E.M., N= 5 - 8 animals.

CAPÍTULO 3

Effect of hypo- and hyperosmotic stress on insulin receptor from anterior gills of *Chasmagnathus granulata* crabs

Autores: Márcia Trapp, Alan Pöppl, Edison Capp, Maria Flávia Ribeiro, Luiz Carlos Kucharski, Roselis S. M. Da Silva

Periódico: General and Comparative Endocrinology

Artigo submetido, Agosto 2005

Effect of hypo- and hyperosmotic stress on insulin receptor from anterior gills of *Chasmagnathus granulata* crabs

Márcia Trapp, Alan Pöppel, Edison Capp, Maria Flávia Ribeiro, Luiz Carlos Kucharski, Roselis S. M. Da Silva

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, RS, Brazil

Correspondence to:
Dr. Roselis S.M. da Silva
Departamento de Fisiologia – ICBS- UFRGS
Rua Sarmiento Leite, 500
90050-170 Porto Alegre – RS- Brazil
fax: +55 51 33163623
e-mail: roselis@ufrgs.br

Abstract

The anterior and posterior gills are in direct contact with the external environment and variations in salinity, temperature, oxygenation directly affect the metabolism of this organ. The function of the anterior gills is related to gas exchanges, while the posterior ones are related to osmoregulating activities. In *Chasmagnathus granulata* insulin binding sites in the gills were identified and the bovine insulin stimulated the auto-phosphorylation and phosphorylation of synthetic substrate in this tissue. The insulin-like receptor was partially cloned in the posterior gills of *Chasmagnathus granulata* (*C. granulata* insulin receptor-like tyrosine kinases – CGIRLTK) and presented a high homology in the tyrosine kinase region with insulins and IGFs of vertebrates and invertebrates.

The aim of the present study was to investigate the effects of hypo-osmotic and hyperosmotic stress on the characteristics and tyrosine kinase activity of CGIRLTK and on glucose uptake in the anterior gills of *Chasmagnathus granulata*.

Insulin binding sites were characterized in plasma membranes of the anterior gills of animals submitted to 24 h of hypo-osmotic stress and 144h of hyperosmotic stress, through studies on binding with ^{125}I -insulin. Tyrosine kinase activity was determined by the insulin receptor capacity to phosphorylate the synthetic substrate poly (Glu; Tyr 4:1). The glucose uptake was evaluated by the incorporation of [^{14}C] 2-deoxy-D-glucose in the gill tissue.

No change was observed in the concentration and affinity of insulin receptors in the anterior gills after 24 h of hypo-osmotic stress. The phosphorylation of the insulin-receptor diminished after 24h of hypo-osmotic stress

and returned to baseline values after 72h. The capacity for glucose uptake, in turn, was not modified by changes in the osmotic environment. During acclimation to hyperosmotic stress, a reduction was observed in the concentration of insulin receptors and in their phosphorylation. However, bovine insulin did not stimulate phosphorylation in the anterior gills in any of the stresses.

The results suggest the presence of tyrosine kinase receptors that do not respond to bovine insulin ($2 \times 10^{-7} \text{M}$), although the phosphorylation is modulated by the type of stress to which the animal is submitted.

Key words: insulin-like receptor, crab gills, insulin binding, tyrosine phosphorylation, hypo-osmotic, hyperosmotic

Introduction

Molecules of the insulin family, which include insulin, insulin-related growth factors (IGFs-I and II), and insulin-like peptides of invertebrates are structurally homologous and present a common evolutionary origin (Smit et al., 1996; Chan and Steiner, 2000).

Insulin-like substances were described in several invertebrate species, ranging from unicellular eukaryotes such as *Tetrahymena pyriformis* (Csaba and Kovacs, 2000; Leick et al., 2001) to representatives of the arthropods, such as *Drosophila melanogaster* (Brogiolo et al., 2001; Vanden, 2001). Homologues to the insulin/IGF receptor have been cloned in some invertebrates, such as cnidarians, arthropods, nematodes and molluscs, and presented several structural similarities to the insulin receptor of vertebrates, especially the tyrosine kinase region of subunit β of the receptor (Yamaguchi et al., 1995; Jonas et al., 1996; Roovers et al.,

1995; Skorokhod et al., 1999). The transduction of the insulin signal also appears to be preserved in these animals that use a few intracellular signals identical to those of mammals (Pertseva and Shpakov, 2002; Claeys et al., 2002).

Chuang and Wang (1994) identified in the muscle of the *Penaeus japonicus* shrimp, insulin-like receptors which were bound to anti-subunit- β insulin receptors of mammals and auto-phosphorylated after incubation with bovine insulin. In the lobster, insulin-like substances were identified in the hepatopancreas (Sanders, 1983a; Gallardo et al., 2003). Welcomme and Devos (1994) identified the presence of GLUT4, an insulin-dependent glucose-transporting protein, in the plasma membrane of the *Carcinus maenas* crab gills.

In the *Chamagnathus granulata* crab, insulin-binding sites were identified in various tissues, and the gill tissue (anterior and posterior gills) presented the highest binding values (Kucharski et al., 1997). Moreover, the receptors present in the gill tissue showed tyrosine kinase activity and auto-phosphorylated when incubated with bovine insulin (Kucharski et al., 1999).

Recently the insulin receptor of *C. granulata* (CGIRLTK) was partially cloned (DQ104241) in the posterior gills, and presented a significant homology in the tyrosine kinase region with the insulin and insulin-like receptors of vertebrates and other invertebrates (Trapp et al., 2002).

Changes in extracellular osmolality affect the transduction of the insulin signal. Hyperosmotic stress caused increased tyrosine kinase activity stimulated by insulin in some types of mammalian cells, such as the skeletal muscle and ovarian cells (Ouwens et al., 2001; Gual et al., 2003a). However, it provokes resistance to

insulin in adipocytes (Gual et al., 2003b). Hypo-osmotic stress activates cytoplasmatic proteins that are common in the insulin cascade, such as the proteins of the MAP kinase family (Kim et al., 2001; Chiri et al., 2004).

The intertidal estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*, is a strong ionic hyper and hypo-regulator. It presents hypo-osmotic hemolymph in concentrated media and hyperosmotic hemolymph in diluted media (Mañe-Gazon et al., 1974), with an isosmotic point in external media between 28.5‰ and 30‰ in winter and summer, respectively (Bromberg 1992). Thus the *Chasmagnathus granulata* crab is an interesting biological model to study the physiological adjustments of cells to different types of stress, since it inhabits an estuarine environment.

During acclimation to osmotic stress, modulation was found of the insulin-receptor characteristics in the posterior gills of *C. granulata*; the affinity and concentration of insulin receptors and tyrosine kinase activity diminished when the animals were submitted to hyperosmotic stress (Trapp et al., 2004).

According to the literature, the anterior gills perform the function of gas exchanges while the posterior ones are related to the adjustments required for osmoregulation (Siebers et al., 1982; Gilles 1982; Genovese et al., 2000; Luquet et al., 2002). However, both the anterior and posterior gills are in direct contact with the external environment and environmental variations of salinity, temperature, oxygenation directly affect the metabolism of this organ (Chittó et al., 2001; Luvizotto-Santos et al., 2003).

Thus, to find out whether osmotic stress influences the transduction of the insulin signal in the anterior gills of *C. granulata*, the objectives of this study were to investigate the characteristics of the insulin receptors in the anterior gills of crabs

submitted to hypo-osmotic and hyperosmotic stress, and to find out the glucose uptake capacity during acclimation to stress.

Material and Methods

Animals

Male *C. granulata* crabs in stage C of the intermoult cycle (Drach and Tchernigovtzeff, 1967), weighing 15 ± 2 g, were collected from Tramandaí Lagoon in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (29°58' S, 50°08'W).

Experimental procedure

In the laboratory, the animals were acclimated in aquaria containing fresh running water at 20‰ salinity, temperature of 25° C in a natural light/dark cycle. The crabs received meat *ad libitum* (about 50g), once a day for 2 weeks (control group). After the acclimation period, the animals were put in aquaria containing artificial seawater (34‰ salinity - hyperosmotic stress) or distilled water (0‰ salinity - hypo-osmotic stress), where they remained for 24, 72 or 144h with food *ad libitum*.

Gill Membrane Preparation

The gill membrane preparation was performed according to Kucharski et al. (1999) with some modification. For each bulk preparation, the animals (n=10-15) were anesthetized by chilling and anterior gills were carefully removed, weighed, and rinsed several times in ice-cold buffer. The gills were homogenized in a Potter-

Elvehjem homogenizer with a Teflon pestle in ice-cold buffer (1:10, w/v) containing 0.3 M sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) and 13 mM EDTA, pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 5,000g for 30 min at 4° C. The supernatant was centrifuged at 30,000g for 20 min at 4° C. The resultant pellet, resuspended with a Dounce-type homogenizer (Kontes Glass Co., Vineland, NJ) in Tris-HCl buffer (50mmol/l, pH 7.4), represents the membranes and was stored at -20°C until use.

Protein measurements

The protein concentration was determined by the Bradford method (1976), using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Insulin-binding assay

The gill membranes (0.4 - 0.5 mg protein) from crab exposed to 0h of stress time (control), 144h of hyperosmotic stress (HrS) or 24h of hypo-osmotic stress (HoS) were incubated in 10mM HEPES, 400mM NaCl (HrS) or 300mM (HoS), 1mM PMSF and 1% BSA, at pH 7.4, with an increasing concentration of unlabeled bovine insulin (0-10 µM) and radiolabelled insulin tracer (50,000 counts/min of human Tyr^{A14-125}I-monoiodoinsulin, 2,000 Ci/mmol specific activity, Amersham Bioscience) (Párrizas et al., 1994). Additional studies were carried out using ¹²⁵I-insulin in the presence or absence of human angiotensin I (250 µg/ml). After incubation for 120 min at 25° C, the ¹²⁵I-insulin was separated from the incubation medium by filtration through a glass microfibre filter (Whatman GF/B, Maidstone, UK). The filter was rinsed with 10ml ice cold incubation buffer with 0.1% BSA and

the radioactivity retained was counted in a LKB scintillation gamma counter. The radioactivity absorbed by the glass microfibre filter in the absence of membrane was less than 0.2% of the total counts.

Substrate phosphorylation

The gill membrane suspensions (40µg of protein) were preincubated with genistein 500µM plus 2×10^{-7} M of bovine insulin, 2×10^{-7} M insulin alone or 2×10^{-7} M BSA, for 30 min at 25° C, and incubated with 0.5µCi of [γ ³²P] ATP (300mCi/nmol) and unlabeled ATP (5µM) in a buffer containing 25 mM Hepes, 10 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, and 2 mM sodium orthovanadate, for 10 min at 25° C. Subsequently, 1 mM poly (GluTyr 4:1) was added for 1h at 25° C. The reaction was stopped by applying the sample to phosphocellulose paper (Kucharski et al., 1999). The paper was rinsed 3 times with 75 mM H₃PO₄ and once with ethanol. The paper with incorporated ³²P-ATP was measured with scintillation liquid on the LKB counter.

[¹⁴C] 2-Deoxy-D-glucose Uptake

For this experiment, anterior gills were removed, chitin cuticle was cut up and the tissue samples (70mg) were immediately washed in buffer. The anterior gills from crab exposed to hyperosmotic stress were washed and incubated in buffer containing 400mM NaCl, 12.2 mM KCl, 11 mM CaCl₂, 93 mM MgCl₂.H₂O, 31mM NaHCO₃, 278mM Na₂SO₄ and 5.8 mM NaBr, plus 10mM Hepes and 0.1 mM PMSF, pH 7.8 (hemolymph osmolality at 34⁰/₀₀ salinity was 853 ± 12.45 mOsm/kg) equilibrated with 5% CO₂:95% O₂. The anterior gills from the control and

hypo-osmotic groups were washed and incubated in the same buffer but the NaCl concentration was changed to 300mM (hemolymph osmolality at hypo-osmotic stress was 636 ± 18.01 mOsm/kg and in the control group 719 ± 10.41 mOsm/kg) (Schein et al., 2005).

The gills were incubated for 120 min (Kucharski et al., 2002) in 500 μ l incubation buffer plus 0.2 μ Ci 1-[14 C] 2-deoxy-D-glucose ([14 C] DG – 39mCi/mmol; Amersham Biosciences).

Following incubation, the gills were rinsed in cold incubation buffer and blotted with filter paper. The [14 C] DG uptake was immediately determined by measuring the extracellular (incubation medium) and intracellular radioactivity (Kucharski et al., 2002). Results are expressed as tissue/medium (T/M) rate, that is, cpm/ml tissue fluid divided by cpm/ml incubation medium.

Statistical analysis

The results were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) with posterior Student–Newmann-Keuls (SNK), by Student's *t*-test or Mann Whitney with posterior Duncan. Significant differences were accepted if $P < 0.05$. These tests were performed with Sigma Stat Statistical Software. Binding data were analyzed by Scatchard plot (Scatchard, 1949) with Prism 4 Software.

Results

Figure 1 represents the insulin-binding curves in the anterior gills of control animals (A), submitted to 144h of hyperosmotic stress (C), and 24h of hypo-osmotic stress (E). The respective Scatchard plots are shown in letters B, D and F. Figure 1A shows that the specific binding in control animals was saturable at low unlabeled insulin concentration. However, the figures 2C and E shows that the specific binding in osmotic stress animals was proportional to unlabelled insulin concentration. The Scatchard plots (both for the control group and for stress) were linear, indicating the presence of receptors with only one binding site for the hormone. The angiotensin I hormone was not able to compete with ^{125}I -insulin, indicating the specificity of the insulin-receptor binding.

The analysis of these graphs revealed the concentration of receptors and their affinity to insulin, shown in tables 1 and 2. The curve resolution (Figure 1A) established a high affinity constant (K_d) of 218.2 fmol and a binding capacity (R_0) of 1.12 fmol/mg of protein. The concentration of receptors (R_0) diminished 8.6 times ($P < 0.05$) in the gill tissue of animals submitted to 144 hours of hyperosmotic stress (Table 1). However, no significant modification ($P > 0.05$) was observed in the concentration of receptors of the gills of animals submitted to hypo-osmotic stress (Table 2). On the other hand the mammalian insulin-receptor affinity was not significantly modified ($P > 0.05$) by the hypo or hyperosmotic stress (Table 1 and 2).

Figure 2 shows the phosphorylation of the synthetic substrate poly (Glu; Tyr 4:1) in the preparations of gill membranes of animals submitted to hypo-osmotic stress. Bovine insulin did not significantly ($P > 0.05$) stimulate the phosphorylation of

the exogenous substrate when compared with the albumin-treated control. However, there was a significant reduction ($P<0.05$) of phosphorylation of the synthetic substrate at 24 hours of stress (in both the albumin and insulin group). At 72h, the phosphorylation values of the synthetic substrate returned to values similar to those of the control group, and stayed at that level until 144h of stress (Fig. 2A). Genistein significantly ($P<0.05$) inhibited (55% to 70%) the phosphorylation of the synthetic substrate in membranes incubated with insulin at all stress times studied (Fig. 2B).

Bovine insulin also did not stimulate significantly ($P>0.05$) the phosphorylation of the exogenous substrate in crab membranes submitted to hyperosmotic stress (Fig. 3A). As a function of the hyperosmotic stress time to which the animals were submitted the phosphorylation capacity of the exogenous substrate decreased, both in the control group (albumin) and in the insulin treatment. In the albumin group this reduction was 32%, 43% and 70% at 24, 72 e 144h of stress, respectively. In the insulin-stimulated group the reduction was 30% at 24 and 72 horas and 70% at 144h of stress. Genistein (Fig. 3 B), a potent inhibitor of tyrosine kinase activity, inhibited phosphorylation by 50% to 70% ($P<0.05$) compared to the insulin group at all times of stress studied.

Figure 4 shows the data referring to 2-deoxy-glucose uptake in the anterior gills of *C. granulata* at different times of hyper and hypo-osmotic stress. No significant differences were observed in the uptake capacity during hypo-osmotic stress compared to the control group, but the hyperosmotic stress caused a significant reduction of the glucose uptake ($P<0.05$) at all times of stress studied. The comparison of the glucose uptake values between hypo and hyperosmotic

stress shows significantly lower values ($P < 0.05$) of hyperosmotic stress at all times studied.

Discussion

Previous studies demonstrated the presence of insulin receptors in the gills of the *Chasmagnathus granulata* crab (Kucharski et al., 1997). The tyrosine kinase activity of these receptors was determined by their capacity to auto-phosphorylate and phosphorylate the synthetic substrate poly (Glu, Tyr 4:1) in the presence of bovine insulin (Kucharski et al., 1999). These authors suggest that in *C. granulata* the transduction of the insulin signal in gill cells is similar to that of mammals: binding of the hormone to the subunit α , auto-phosphorylation of subunit β , phosphorylation of cytoplasmic proteins.

Since no molecule with insulin activity has been isolated yet in *C. granulata*, bovine insulin was used in this study. It has been well documented in the literature that mammalian insulin stimulates glycogenesis in the lobster muscle *in vitro* (Sanders, 1983b), increases the transport of hexose in the muscle of the *Balanus balanus* barnacle (Baker and Carruthers, 1980) and in the gills of the *Carcinus maenas* and *Chasmagnathus granulata* crabs (Welcomme and Devos, 1994; Kucharski et al., 2002). Besides this, mammalian insulin has been used in several studies on insulin-receptor characteristics in insects, mollusks and other crustaceans (Petruzzelli et al., 1986; Chuang and Wang, 1993; 1994; Yamaguchi et al., 1995; Jonas et al., 1996; Kucharski et al., 1997, 1999; Gricourt et al., 2003).

Kucharski et al. (1997) demonstrated, *in vivo* and *in vitro*, the presence of insulin-binding sites in anterior and posterior gills, but to determine the affinity

constant they used membrane preparations with posterior and anterior gills together. However, in this study comparing the affinity constant and the concentration of receptors among isolated anterior and posterior gill preparations, found that in the anterior ones the receptor affinity is significantly ($P < 0.05$) higher than in the posterior gills, but the concentration of receptors is similar in both gills. It has been established that the higher affinity of the hormone to its receptor, the lower will be the dissociation of the hormone receptor complex, which would account for the lack of insulin stimulus in the phosphorylation of the exogenous substrate found in this study. In posterior gills bovine insulin significantly increased the phosphorylation of poly (Glu:Tyr 4:1) (Trapp et al., 2004). This information agrees with the results obtained by Kucharski et al. (2002) who demonstrated that mammalian insulin only stimulated the glucose uptake and glycogen synthesis in posterior gills, no effect was found on the anterior gills. Moreover, we must take into account that we are working with bovine insulin that probably is a poor homolog of endogenous crab insulin or insulin-related peptide.

In the present study, bovine insulin did not stimulate the phosphorylation of the synthetic substrate in the anterior gills to the control group (0h) and at none of the hyper or hypo-osmotic stress times to which the animals were submitted. However, the genistein caused the inhibition of the kinase activity of the membrane receptors of the anterior gills in all the experimental groups.

Genistein, which is a potent competitive inhibitor of tyrosine kinase, has been used in several studies on the phosphorylation of insulin receptors in vertebrates (Clemente et al., 1995; Han and Lee, 2005; Bazuine et al., 2005). The presence of this compound in the incubation medium was able to inhibit the

phosphorylation of the synthetic substrate in all experimental groups studied in the present work. The phosphorylation of proteins is one of the most important mechanisms in the regulation of the cell function. Proteins may be phosphorylated in serine, treonine or tyrosine residues. Most of the phosphorylations occur in serine or treonine, with less than 1% in tyrosine residues (Lau and Hugarir, 1999). In this way, the phosphorylation of proteins in tyrosine residues is extremely specific. This information reinforces the results obtained in the present study, that the proteins phosphorylated in the plasma membrane of anterior gills belong to the family of the tyrosine kinase receptors like the insulin and the IGF-I receptors of vertebrates.

The hypo- and hyperosmotic stress data indicate that the type of stress to which the animals are submitted modulates the characteristics of the tyrosine kinase receptors found in the anterior gills.

The reduction observed in the concentration of receptors in the anterior gills during hyperosmotic stress was also observed in the posterior gills (Trapp et al., 2004) at the same type and time of stress. This shows that hyperosmotic stress affects both the posterior gills that are classically involved in the acclimation to osmotic stress, and the anterior ones that are related to animal respiration (Gilles 1982; Welcomme and Devos, 1991; Luquet et al., 2002).

The comparison of the data achieved in this study in binding experiments with crab anterior gill membranes and those obtained by Trapp et al. (2004) with posterior gills suggests that this organ possesses different isoforms of insulin receptors or insulin receptors that binding insulin with distinct affinities. In almost all the invertebrates studied up to the present, several isoforms of the hormone were

observed compared to a single type of receptor, as in *Lymnaea stagnalis*, *D. melanogaster*, *C. elegans* (Roovers et al., 1995; Petruzelli et al., 1986; Kimura et al., 1997). These isoforms are different from each other and from mammalian insulin and bind with different affinities to the same receptor.

The anterior gills of euryhaline crustaceans are not a tissue that is classically related to acclimation to stress, but probably their functioning is modified by these periods of stress and the modifications observed in this study suggest that the tyrosine kinase receptors are involved in this process. This was the first study to demonstrate that osmotic stress causes modifications in tyrosine kinase receptors in the anterior gills.

Only bovine insulin was effective to displace the ^{125}I -insulin bound to gill membrane, and the hypo- and hyperosmotic stress increase the unlabeled insulin necessary to saturate the insulin receptor what could be explain for the increase in dissociation in consequence of the low affinity. In addition, the linear Scatchard plot of the saturably of unlabelled insulin indicates the presence of only one binding site as observed by Kucharski et al (1999). Moreover, the Scatchard plot shows that the hyperosmotic stress decreases the receptor concentration and 24h of hypo-osmotic stress did not change the receptor concentration.

No change was observed in the concentration and affinity of insulin receptors in the anterior gills after 24h of hypo-osmotic stress. Moreover, insulin receptor phosphorylation diminished after 24h of stress and returned to baseline values after 72 and 144h. In those conditions, the glucose uptake capacity was not modified during hypo-osmotic stress. On the other hand, the glucose uptake decrease found in anterior gills during the acclimation to hyperosmotic was

probably due to the decrease in the concentration and phosphorylation capacity of the receptors when the crabs were exposed to osmotic stress.

The results presented in this study suggest the presence of tyrosine kinase activity receptors in the anterior gills of *C. granulata* with characteristics different from the receptors observed in the posterior gills (Trapp et al., 2004). The receptors of the anterior gills are less sensitive to bovine insulin and their phosphorylation was not stimulated by it. However, investigations using other types of molecules of the insulin family, such as bombyxin, insulin-like of the lobster, drosophila or fish, would be important to explain those results.

Acknowledgements

This work was supported by grants from, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brazil. Graduate scholarships to A.P., postgraduate scholarships to M.T. (CNPq) and research grant to R.S.M.S. (CNPq). The authors wish to thank Biobrás for donating the bovine insulin.

References

- Baker, P.F. and Carruthers, A. 1980. Insulin stimulates sugar transport in giant muscle fibres of the barnacle. *Nature*. 286, 276-279.
- Bazuine M, van den Broek PJA, Maassen JA. 2005. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 326 (2), 511-514.
- Bradford, M.M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broggiolo, W.; Stocker, H.; Ikeya, T.; Rintelen, F.; Fernandez, R.; Hafen, E, 2001. An evolutionary conserved function of the *Drosophila* insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* 11, 213-221.
- Bromberg, E. 1992. *Dinâmica osmo e ionorregulatória de Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse

hiper ehiposmótico no inverno e no verão. Tese (Doutorado em Oceanologia Biológica)-Instituto de Ciências. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Chan, S.J., Steiner, D.F, 2000. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Amer. Zool.* 40, 213-222.

Chiri, S., Bogliolo, S. Ehrenfeld, J., Ciapa, B., 2004. Osmotic stress in renal epithelial A6 cells. *Biochim. Biophys. Acta- biomembranes.* 1664(2), 224-229.

Chittó, A.L., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e o efeito do ácido picolínico sobre a gliconeogênese em brânquias de caranguejo *Chasmagnathus granulata*. XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Caxambu, MG, Brazil, Abstract p.416.

Chuang, N-N. and Wang, P-C, 1993. Characterization of phosphotyrosyl protein phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Zool.* 266, 181-187.

Chuang, N-N. and Wang, P-C, 1994. Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* 108, 289-297.

Claeys, I.; Simonet, G.; Poels, J.; Van Loy, T.; Vercammen, L.; De Loof, A.; Vanden Broeck, J. 2002. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides.* v.23, p.807-816.

Clemente R, Jones Dr, Ochoa P, Romero G, Mato Jm, Varelanieto I. 1995. Role of glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis as a mitogenic signal for epidermal growth-factor. *Cell Signal.* 7 (4), 411-421.

Csaba, G., Kovacs, P, 2000. Insulin uptake, localization and production in previously insulin treat and untreated *Tetraymena*. Data on the mechanism of hormonal imprinting. *Cell. Biochem. Funct.* 18, 161-167.

Drach, F. and Tchernigovtzeff, C, 1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie Milieu.* 161, 595-607.

Gallardo, N., Carrillo, O., Moltó, E., Deás, M., González-Suárez, R., Carrascosa, J.M., Ros, M., Andrés, A, 2003. Isolation and biological characterization of a 6-kDa protein from hepatopâncreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 131, 284-290.

Genovese, G; Luquet, CM; Paz, DA; Rosa, GA; Pellerano, GN. 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper-and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. *J Anat.* 197, 239-246.

Gilles, R. 1982. Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. *Bol Fisiol Animal USP.* 6, 1-36.

- Gricourt, L.; Bonnac, G.; Boujard, M.; Kellner, K. 2003. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrlGF-I effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134, 44-56.
- Gual, P., González, T., Grémeaux, T., Barrés, R., Le Marchand-Brustel, Y. Tanti, J.F., 2003a. Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 278(29), 26550-26557.
- Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y. Tanti, J.F., 2003b. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Diabetes Metab.* 29, 566-575.
- Han HJ, Lee YJ. 2005. Insulin stimulates Ca²⁺ uptake via PKC, cAMP, and p38 MAPK in mouse embryonic stem cells. *Life Sciences.* 76 (25), 2903-2919.
- Jonas, E.A.; Knox, R.J.; Kaczmarek, L.K.; Schwartz, J.H.; Solomon, D.H. 1996. Insulin receptor in *Aplysia* neurons: characterization, molecular cloning, and modulation of ions currents. *J. Neurosci.* v.16, p.1645-1658.
- Kim, R.D., Stein, G.S., Chari, R.S., 2001. Impact of cell swelling on proliferative signal transduction in the liver. 83(1), 56-69.
- Kimura, K.D.; Tissenbaum, H.A.; Liu, Y.; Ruvkun, G. 1997. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. 277: 942-946.
- Kucharski, L.C., Ribeiro, M.F., Schein, V., Da Silva, R.S.M., Marques, M, 1997. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *J Exp Zool.* 279, 118-125.
- Kucharski, L.C., Schein, V., Capp, E., Da Silva, R.S.M, 2002. *In vitro* insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 256-263.
- Kucharski, L.C.; Capp, E., Chittó, A.L.F.; Trapp, M.; Marques, M; Da Silva, R.S.M, 1999. Insulin signaling: tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. *J. Exp. Zool.* 283, 91-94
- Lau, L. and Haganir, R.L.,1999. Cap. 25: Tyrosine phosphorylation. In: Siegel, G.J.; Agronoff, B.W.; Alberts, R.W.; Fisher, S.K.; Uhler, M.D. *Basic Neurochemistry (Molecular, Cellular and Medical Aspects)* 6^a ed. New York: Lippincott – Raven.
- Leick, V., Bog-Hansen, T.C., Juhl, H.A., 2001. Insulin/fgf-binding ciliary membrane glycoprotein from tetraymena. *J. Membr. Biol.* 181, 47-53.
- Luquet, C.M.; Genovese, G.; Rosa, G.A.; Pellerano, G.N. 2002. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. *Mar. Biol.*141, 753-760.
- Luvizotto-Santos R, Lee JT, Branco ZP, Bianchini A, Nery LEM Luvizotto-Santos. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J Exp Zool A-Comp Exp Biol.* 295A (2), 200-205.

- Mañe-Gazon, F.; Dei-Cas, E.; Spector, B.H.; Leymonte, J. 1974. Estudios sobre la biología Del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. In: Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. *Physis. Sección A.* 33(86), 163-171.
- Ouwens, D.M.; Mesquita, D.S.G.; Dekker, J.; Maassen, J.A. 2001. Hyperosmotic stress activates the insulin receptor in CHO cells. *Bioch. Bioph. Acta.* 1540: 97-106.
- Párrizas, M., Planas, J., Plisetskaya, E.M., Gutiérrez, J, 1994. Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.* 266, 1944 -1950.
- Pertseva, M.N.E Shpakov, A.O. 2002. Conservatism of the insulin signaling system in evolution of invertebrate and vertebrate animals. *J. Evol. Biochem. Physiol.* v.38, n.5, p.547-561.
- Petruzzelli, L.; Herrera, R.; Arenas-Garcia, R.; Fernandez, R.; Birnbaum, M.J.; Rosen, O.M. . 1986. Isolation of a Drosophila genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated Drosophila receptor with an anti-peptide anti-body. *Proc Nat Acad Sci.* 83, 4710-4714.
- Roovers, E.; Vincent, M.E.; Vankesteren, E.; Geraerts, W.P.M.; Planta, R.J.; Vreugdenhil, E.; Vanheerikhuizen, H. 1995. Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene.* v.162, n.2, p.181-188.
- Sanders, B. 1983a. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. I. Insulin immunoreactivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 366-373.
- Sanders, B. 1983b. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . II. Insulin-like biological activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 50, 374-377.
- Scatchard, G, 1949. The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660-667.
- Schein, V. Chittó, A.L.F., Etges, R., Kucharski, L.C., Van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S.M, 2005. Effects of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140, 561-567.
- Siebers D, Leweck K, Markus H, Winkler A. 1982. Sodium-regulation in the shore crab *carcinus-maenas* as related to ambient salinity. *Marine Biology.* 69 (1), 37-43.
- Skorokhod A, Gamulin V, Gundacker D, Kavsan V, Muller IM, Muller WEG.1999. Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biological Bulletin.* v.197, n.2, p.198-206.
- Smit, A.B., Spijker, S., Van Minnen, J., Burke, J.F., De Winter, F., Van Elk, R., Geraerts, W.P., 1996. Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience.* 70, 589-596.
- Trapp, M, Schein, V, Wache, Y, Favrel, P, Capp, E, Kucharski, LC, Van Wormhoudt, A, Da Silva, RSM. 2002. Tyrosine kinase activity of the of the insulin

receptor from *Chasmagnathus granulata* gills and partial cloning of insulin receptor gene. *Procced. 21st Conf Eur Comp Endocrinol* 1: 375-379.

Trapp, M. Pöple, A., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2004. Atividade tirosina quinase do receptor à insulina e captação de 2-deoxi-glicose-14C em *Chasmagnathus granulata* submetido ao estresse hiperosmótico. *Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE)*.

Vanden Broeck, J, 2001. Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides*. 22, 241-254.

Wellcomme, L. and Devos, P, 1994. Immunological identification and biochemical characterization of glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas* (L). *J. Exp. Zool.* 268, 218-223.

Wellcomme, L. E Devos, P. 1991. Energy consumption in the perfused gills of the crab euryhaline *Eriocheir sinensis* adapted to freshwater. *J. Exp. Zool.* 257, 150-159.

Yamaguchi, T.; Fernandez, R.; Roth, R.A.. 1995. Comparison of the signaling abilities of the drosophila and human insulin receptors in mammalian cells. *Biochemistry*. 34, 4962-4968.

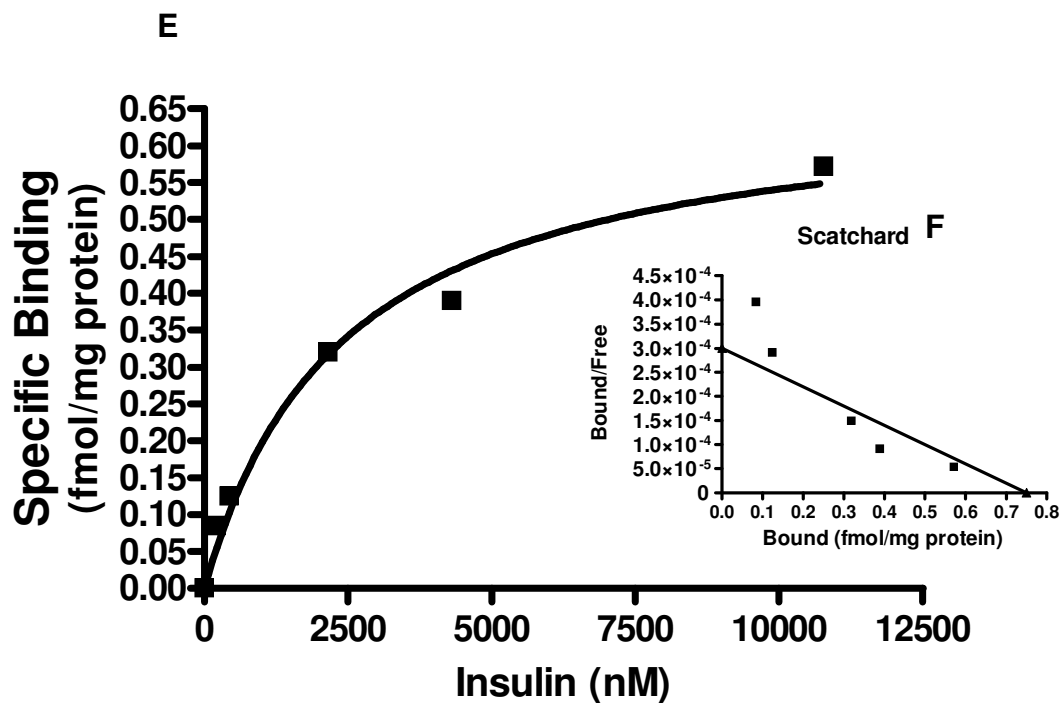


Fig 1. Binding of ^{125}I -insulin to anterior gills membranes. **A-** ^{125}I – insulin binding saturably to gill membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in control group (CG). No competition was observed using angiotensin I (o); **B** - Scatchard plot analysis of the saturation data of membrane preparation (CG); **C-** ^{125}I – insulin binding saturably to gill membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in the anterior gill membrane from the hyperosmotic stress group (HrG) by increased amounts of unlabelled bovine insulin; **D-** Scatchard plot analysis of the saturation data of membrane preparation (HrG). **E-** ^{125}I – insulin binding saturably to gill membranes by increased amounts of unlabelled bovine insulin in hypo-osmotic group (HoG); **F-** Scatchard plot analysis of the saturation data of membrane preparation. The ^{125}I – insulin binding saturably and scatchard plot results are representative of 3 experiments in duplicate.

Table 1. Characteristics of insulin binding receptor in anterior gill membranes of control group (CG) and of crab submitted to hyperosmotic stress (HrG).

Groups	Ro (fmol / mg protein)			Kd (fmol)		
	median	25%	75%	median	25%	75%
CG	1.12	1.08	1.16	218.2	60.8	5998
HrG	0.13*	0.11	0.19	970	662.2	1925

Data are given as median \pm interquartile interval of 25 to 75%.

Results are representative of at least 3 experiments done with different microsome membranes. Ro, receptor concentration (binding capacity) fmol/mg protein; Kd, affinity (dissociation constant). Superscript symbols that differ across rows denote values significantly different from each other at $P < 0.05$.

* = significant difference of Ro as compared to the control group

Table 2. Characteristics of insulin binding receptors in anterior gill membranes of control group (CG) and of crab submitted to hypo-osmotic stress (HoG).

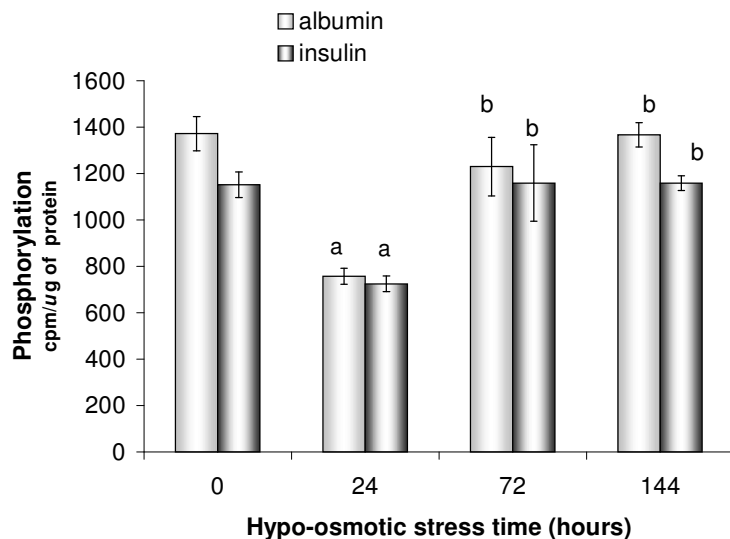
Groups	Ro (fmol / mg protein)			Kd (fmol)		
	median	25%	75%	median	25%	75%
CG	1.12	1.08	1.16	218.2	60.8	5998
HoG	1.48	0.43	3.3	1573	774	33669

Data are given as median \pm interquartile interval of 25 to 75%.

Results are representative of at least 3 experiments done with different microsome membranes. Ro, receptor concentration (binding capacity) fmol/mg protein; Kd, affinity (dissociation constant).

Fig 2.

A



B

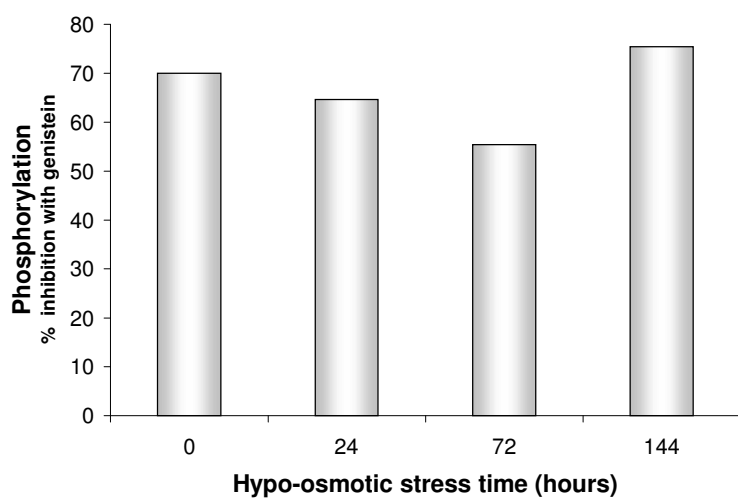


Fig 2. Phosphorylation of a substrate poly (GluTyr 4:1) with 0.5 μCi of $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was measured with or without bovine insulin and genistein. The results are shown as cpm/ μg of membrane protein. A) Data referring to the phosphorylation of anterior gills of animals submitted to different hours of hypo-osmotic stress; B) Percentage of inhibition of phosphorylation when the membranes were incubated with genistein. The membranes treated with genistein showed a reduction in the

phosphorylation of the synthetic substrate as compared to the insulin group in all stress times.

N= 3 – 6 pools of gills in triplicate at each point. $P < 0.05$

a = significant difference as compared to the control group.

b = significant difference as compared to the 24hours of stress time.

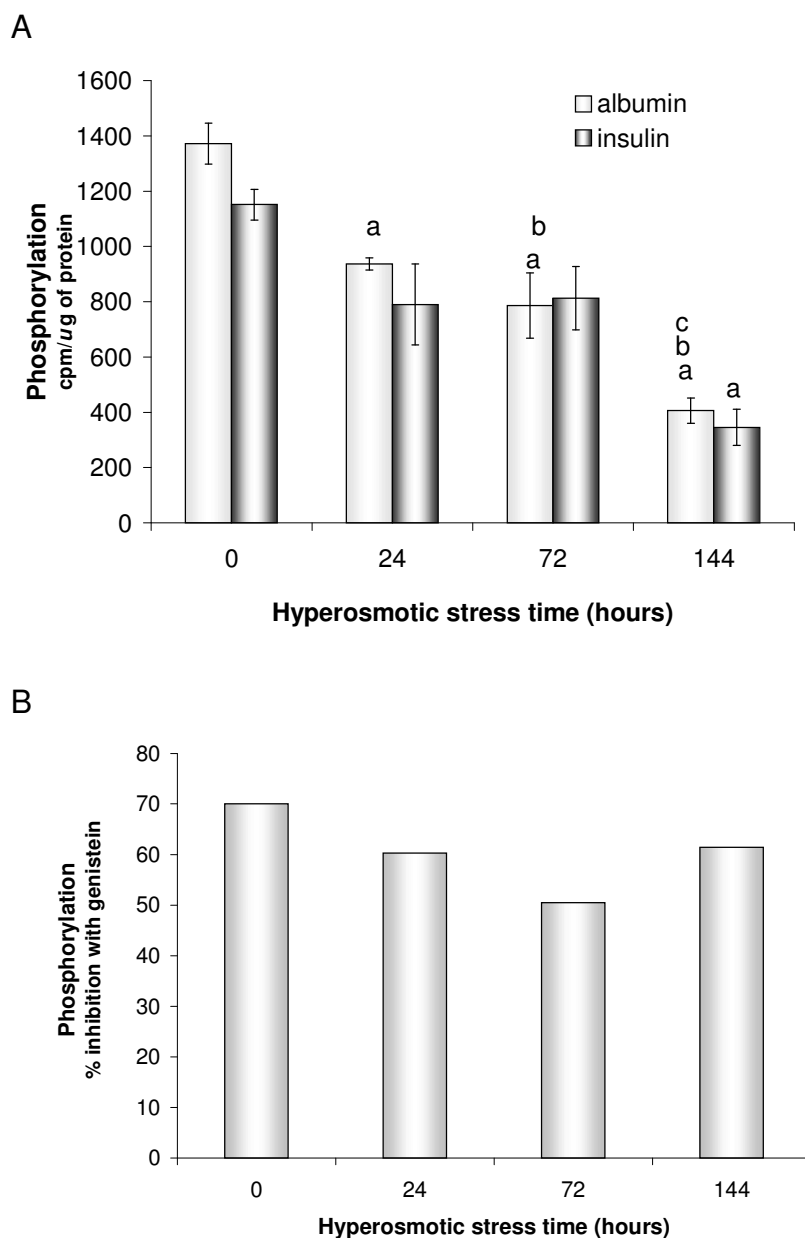


Fig 3. Phosphorylation of a substrate poly (GluTyr 4:1) with 0.5 μCi of $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ was measured with or without bovine insulin and genistein. The results are shown as $\text{cpm}/\mu\text{g}$ of membrane protein. A) Data referring to the phosphorylation of anterior gills of animals submitted to different hours of hyperosmotic stress; B) Percentage of inhibition of phosphorylation when the membranes were incubated with genistein.

The membranes treated with genistein showed a reduction in the phosphorylation of the synthetic substrate as compared to the insulin group in all stress times.

N= 3 – 6 pools of gills in triplicate at each point. $P < 0.05$

a = significant difference as compared to the control group.

b = significant difference as compared to the 24hours of stress time.

c = significant difference as compared to the 72hours of stress time.

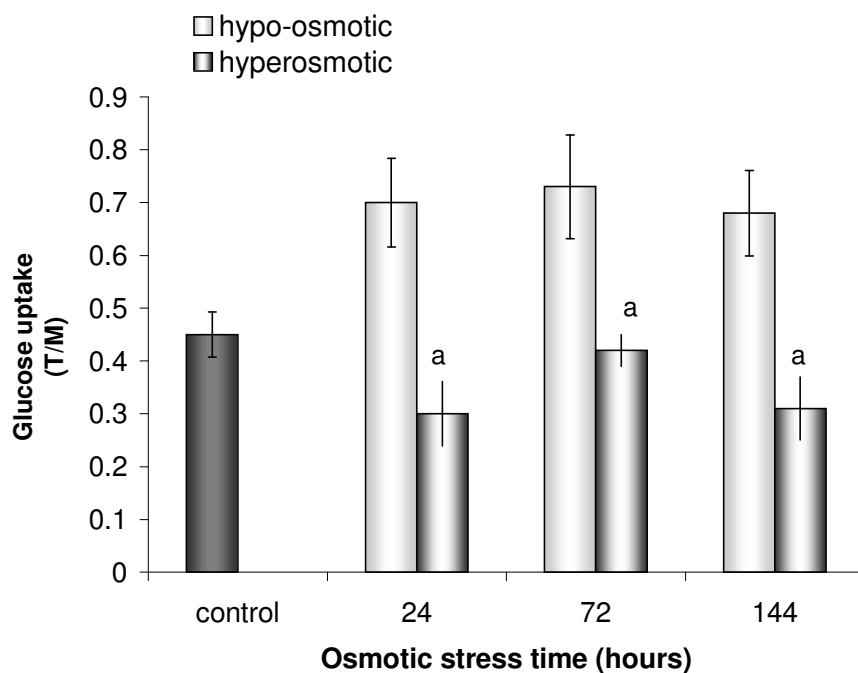


Fig 4. Effect of hyperosmotic and hypo-osmotic stress on 2-deoxy-D-¹⁴C glucose uptake in anterior gills. Data are given as mean \pm S.E.M., $N= 5 - 8$ animals.

a = significant difference ($p < 0.05$) compared to the control group

At all times of stress studied there was a significant difference ($p < 0.05$) between the types of stress (hyper and hypo-osmotic).

***CONCLUSÕES E
PERSPECTIVAS FUTURAS***

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O estresse hiperosmótico causa marcante resistência à insulina nas brânquias posteriores, com redução do número de receptores, da afinidade e da fosforilação estimulada pela insulina. Essa resistência teria como objetivo diminuir os efeitos anabólicos da insulina permitindo dessa forma a aclimatação a este tipo de estresse, pois as células branquiais precisam aumentar o catabolismo (efeito contrário ao causado pela insulina nas brânquias posteriores) para aumentar a concentração de osmólitos intracelulares.

Nas brânquias anteriores foi observada também uma diminuição na atividade tirosina quinase e no número dos CGIRLTK, embora a afinidade dos receptores pela insulina bovina não tenha sido modificada pelo estresse. Mesmo as brânquias anteriores não sendo um tecido classicamente envolvido com a regulação osmótica, essa alteração nas características dos CGIRLTK provavelmente tem uma relação direta com a regulação de volume celular. As brânquias anteriores, assim como as posteriores, estão em contato direto com o meio externo e o aumento da salinidade ambiental deve ser compensado com o aumento do catabolismo em ambos os tecidos.

O estresse hiposmótico modula a transdução do sinal insulínico de forma diferente a do estresse hiperosmótico. Nas brânquias posteriores, 24h de estresse hiposmótico causaram diminuição da afinidade dos receptores e tendência a aumento do número de receptores. A fosforilação diminuiu às 24h, e a insulina não foi mais capaz de estimular a fosforilação do substrato exógeno, com retorno aos níveis basais às 144h. Assim, essa modulação é dependente do tempo de estresse ao qual o animal está submetido. Como tanto a insulina quanto o

estresse hiposmótico causam o anabolismo, nas primeiras horas de estresse hiposmótico ocorre uma diminuição do sinal insulínico para permitir à célula os ajustes necessários à osmorregulação. Após esse período inicial, o sinal da insulina é estimulado novamente, sugerindo uma relação deste hormônio com a segunda fase de ajuste osmótico, que envolve o anabolismo com aumento de síntese de proteínas que seria estimulada pela insulina.

Nas brânquias anteriores, durante a aclimatação ao estresse hiposmótico, nem o número nem afinidade dos receptores à insulina variam, entretanto ocorre uma diminuição da fosforilação às 24h de estresse osmótico e retorno aos níveis basais às 72h, perfil de resposta semelhante ao observado nas brânquias posteriores.

Existem diferenças nas respostas das brânquias anteriores e posteriores no estado basal, pois as posteriores mostraram-se responsivas à insulina bovina, com o aumento da fosforilação do CGIRLTK, enquanto que nas brânquias anteriores nenhuma modificação na fosforilação do substrato exógeno foi constatada após estimulação com insulina. Contudo, a afinidade dos receptores à insulina bovina nas brânquias anteriores é cerca de 3 vezes maior do que nas brânquias posteriores; levando um estado de resistência à insulina.

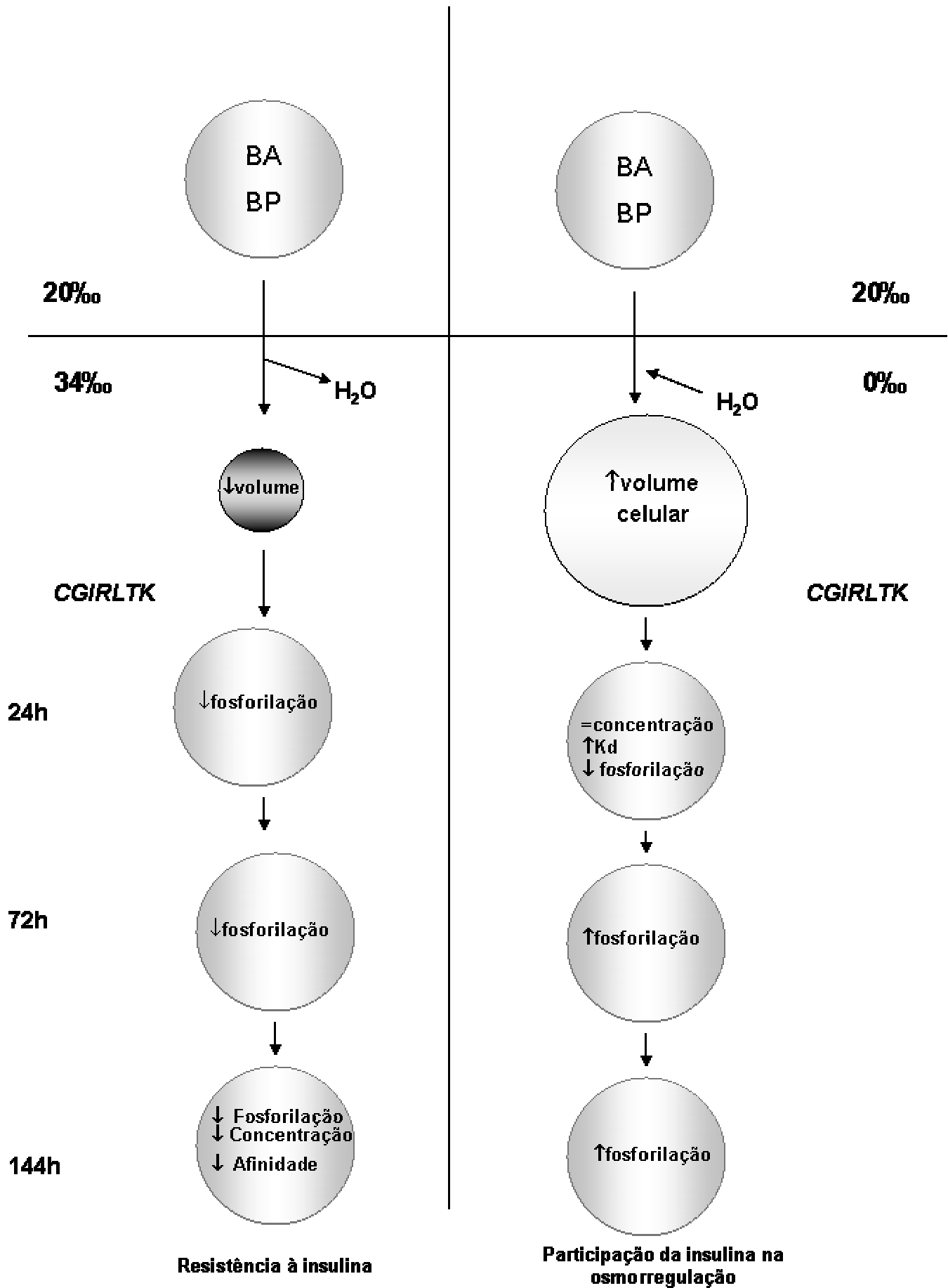
Experimentos utilizando outro tipos de substâncias da família da insulina, como as bombixinas, as insulinas de peixes ou do próprio *C. granulata* seriam interessantes e esclarecedores para verificar as diferenças nas respostas dos receptores insulínicos brânquiais face às alterações de salinidade do meio ambiente.

Este trabalho abriu novas perspectivas na área de investigação sobre os mecanismos envolvidos no processo de osmorregulação em crustáceos, demonstrando pela primeira vez a modulação nas primeiras etapas deste processo do sinal insulínico pelo estresse osmótico. Estudos posteriores envolvendo a expressão do CGIRLTK nos diferentes tempos de estresse hiper e hiposmótico complementarão os resultados obtidos.

Outro aspecto interessante também seria o estudo da variação de volume celular durante as diferentes fases do estresse para verificar como as células se comportam durante a aclimação e em que momento o volume celular está sendo modificado.

O estudo de fases posteriores da transdução do sinal da insulina, como a fosforilação de proteínas da família do IRS-I ou PI3K e até mesmo dos transportadores de glicose GLUT4, de aminoácidos e síntese de proteínas seriam muito interessantes de serem investigados durante a aclimação ao estresse.

Os resultados obtidos nesse trabalho permitiram postular o seguinte esquema sobre as modificações nas características do receptor à insulina e na transdução do sinal insulínico nas brânquias de *C. granulata* submetidos ao estresse hiper e hiposmótico:



Desta forma, o sinal insulínico é modificado diferentemente conforme o tipo de estresse e o tempo ao qual o animal é submetido. As brânquias posteriores são o tecido mais responsivo à insulina no estado basal (20%), contudo, durante o estresse osmótico são observadas alterações nas características do CGIRLTK tanto nas brânquias anteriores quanto nas posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONOWSKI, J.; GIOTTA, J.C.; WAXHAM, M.N. Ischemia induced translocation of Ca^{+2} /calmodulin dependent protein kinase II potential role in neural damage. *J. Neurochem.* v.58, p.1743-1753, 1992.

BISHOP, S.H. e BURTON, R.S. Amino acid synthesis during hyposmotic stress in *Penaeus aztecus postlarvae*. *Comp. Biochem. Physiol.* v.106A, n.1, p.49-56, 1993.

BOCK, C. *Efeitos do estresse hiposmótico ou hiperosmótico, in vitro, sobre a síntese de proteínas, mobilização de proteínas, captação e oxidação de aminoácidos, em tecidos do caranguejo Chasmagnathus granulata*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Departamento de Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

BÖHNI, R.; RIERGO-ESCOVAR, J.; OLDHAM, S.; BROGIOLO, W.; STOCKER, H.; ANDRUSS, B.F.; BECKINGHAM, K.; HAFEN, E. Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homologue of vertebrate IRS1-4. *Cell.* v.97, p.865-875, 1999.

BOND-BUCKUP, G.; FONTOURA, N.F.; MARRONI, N.P.; KUCHARSKI, L.C. *O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia*. Porto Alegre: Editora da Universidade – UFRGS, 1991.

BOTTO, J.L. e IRIGOYEN, H.P. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. contribucion al conocimiento biologico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimentol Plataf. Cont. Atlant Sur, UNESCO-Montevideo, p.161-169. 1980.

BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* v.72, p.248-254, 1976.

BROGIOLO, W.; STOCKER, H.; IKEYA, T.; RINTELEN, F.; FERNANDEZ, R.; HAFEN, E. An evolutionary conserved function of the *Drosophila* insuli-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* v.11, p.213-221, 2001.

BROMBERG, E. *Dinâmica osmo e ionorregulatória de Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiperosmótico no inverno e no verão. Tese (Doutorado em Oceanologia Biológica)-Instituto de Ciências. Rio Grande: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.

BRUNING, J.C.; GAUTAM, D.; BURKS, D.J.; GILLETTE, J.; SCHUBERT, M.; ORBAN, P.C.; KLEIN, R.; KRONE, W.; MULLER-WIELAND, D.; KAHN, C.R. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* v.289, p.2122-2125, 2000.

CASTILHO, C.P.; MARTINS, I.A.; BIANCHINI, A. Gill Na^+ , K^+ -ATPase osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* v.256, p.215-227, 2001.

CHAN, S.J.; e STEINER, D.F. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Amer. Zool.* v.40, p.213-222, 2000.

CHAUSSON, F. e REGNAULT, M. Teneur en glycogène des branchies de *carcinus maenas* (Crustacé Décapode): caparaison entre branchies antérieures et postérieures. *Cah. Biol. Mar.* v.36, p.291-297, 1995.

CHEATHAM, B. & KAHN, R. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrine Rev.* v.16, p.117-142, 1995.

CHEN, D.; ELEMNDORF, J.S.; OLSON, A.L.; LI, X; EARP, H.S.; PESSIN, J.E. Osmotic shock stimulates GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes by a novel tyrosine kinase pathway. *J. Biol. Chem.* v.272, p.27401-27410, 1997.

CHIRI, S.; BOGLIOLO, S.; EHRENFELD, J.; CIAPA, B. Action of extracellular signal-regulated kinase ERK after hypo-osmotic stress in renal epithelial A6 cells. *Biochem. Biophysica Acta.* v.1664, p.224-229, 2004.

CHOMCZYNSKI, P. AND SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal. Biochem.* v.162, p.156-159, 1987.

CHUANG, N-N. e WANG, P-C. Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.* v.108, p.289-297, 1994.

CHUANG, N-N. e WANG, P-C. Characterization of phosphotyrosyl protein phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Zool.* v.266, p.181-187, 1993.

CLAEYS, I.; SIMONET, G.; POELS, J.; VAN LOY, T.; VERGAMMEN, L.; DE LOOF, A.; VANDEN BROECK, J. Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides.* v.23, p.807-816, 2002.

COPELAND, D.E. e FIZJARRELL, A.T. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* v.92, p.1-22, 1968.

CZECH, M.P. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* v.47, p.357-381, 1985.

D'INCAO, F.; SILVA, K.G.; RUFFINO, M.L.; BRAGA, A..C. Hábito alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) na barra de Rio Grande, RS. (Decapoda, Grapsidae). *Atlântica.* v.12, n.2, p.85-93, 1990.

DEVLIN, T.M. (Coord.) *Manual de bioquímica com correlações clínicas*. 5.ed. Tradução Yara M. Michelacci. São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

DRACH, P. e TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu*, v.18, p.595-607, 1967.

DRUMMOND-BARBOSA, D. e SPRADLING, A.C. Stem cells and their progeny respond to nutritional changes during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* v.231, p.265-278, 2001.

ECKHADT, E.; PIERROT, C.; THUET, P.; VAN HERP, F.; DAURES, C.M.; TRILLES, J.P.; CHARMANTIER, G. Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Poligrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a salivary gland peptide. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.99, p.169-177, 1995.

ENGEL, D.W.; FERGUNSON, R.L.; EGGERT, L.D. Respiration rates and ATP concentrations in the excised gills of the blue crab as a function of salinity. *Comp. Biochem. Physiol.* v.52A, p.669-673, 1975.

EPPLE, A. e BRINN, J.E. *The Comparative Physiology of the Pancreatic Islets*. In: DS Farner (coord ed) *Zoophysiology*, v.21. New York: Springer-Verlag, p.9-122. 1987.

FERNANDEZ-ALMONACID, R. e ROSEN, O.M. Structure and ligand specificity of the *Drosophila melanogaster* insulin receptor. *Mol. Cell. Biol.* v.7, n.8, p.2718-2727, 1987.

FLOYD, PD.; LI, L.; RUBAKHIN, SS.; SWEDLER, JV.; HORN, CC.; KUPFERMANN, I. ALEXEEVA, VY.; ELLIS, TA.; DEMBROW, NC.; WEISS, KR.; VILIM, FS. Insulin prohormone processing, distribution and relation to metabolism in *Aplysia californica*. *J. Neurosci.* v.19, n.18, p.7732-7741, 1999.

FREIRE, C.A.; McNAMARA, J.C.; ROSA, J.C.; GREENES, L.J. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): free amino acid concentrations in the hemolymph. *Gen. Comp. Endoc.* v.100, p.83-91, 1995.

FULLBRIGHT, G.; LACY, E.R.; BULLESBACH, E.E. The prothoracicotropic hormone bombyxin has specific receptors on insect ovarian cells. *European Journal of Biochemistry*. v.245, n.3, p.774-780, 1997.

GALLARDO, N., CARRILLO, O., MOLTÓ, E., DEÁS, M., GONZÁLEZ-SUÁREZ, R., CARRASCOSA, J.M., ROS, M., ANDRÉS, A. Isolation and biological characterization of a 6-kDa protein from hepatopancreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.131, p.284-290, 2003.

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

GILLES, R. e DELPIRE, E. *Variations in salinity, osmolality, and water availability vertebrates and invertebrates*. In: DANTZELER, W.H. (ed). Handbook of comparative physiology. Oxford University Press, New York, p.1523-1586, 1997.

GILLES, R. Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. *Bol. Physiol. Animal USP*. v.6, p.1-36, 1982.

GILLES, R. "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stress: history and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* v.117, n.3, p.279-290, 1998a.

GILLES, R. Organic 'compensatory' osmolytes in osmolarity control and hydration changes in animal cells. *S. Afr. J. Zool.* v.33, n.2, p.76-86. 1998b.

GRAF, R.; NEUENSCHWANDER, S.; BROWN, M.R.; ACKERMANN, U. Insulin-mediated secretion of ecdysteroids from mosquito ovaries and molecular cloning of the insulin receptor homolog from ovaries of bloodfed *Aedes aegypti*. *Insect Molec. Biol.* v.6, p.151-163, 1997.

GREGOIRE, F.M.; CHOMIKI, N.; KACHINSKAS, D.; WARDEN, C.H. Cloning and developmental regulation of a novel member of the insulin-like gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.249, p.385-390, 2000.

GRICOURT, L.; BONNEC, G.; BOUJARD, M.; KELLNER, K. Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hrlGF-I effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.134, p.44-56, 2003.

GUAL, P.; GONZALEZ, T.; GRÉMEAUX, T.; BARRÉS, R.; MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.F. Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3t3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* v.278, n.29, p.26550-26557, 2003b.

GUAL, P.; MARCHAND-BRUSTEL, Y.; TANTI, J.F. Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. *Diabetes Metab.* v.29, p.566-575, 2003a.

HAGER, S.R. e BITTAR, E.E. Hormones and the barnacle muscle fiber as a preparation. *Comp. Biochem. Physiol.* v.81, p.247-252, 1985.

HÄUSSINGER, D.; LANG, F.; GEROK, W. Regulation of cell function by the cellular hydration state. *Am. J. Physiol.* v.267, p.E343-E355, 1994.

HELBLING, P. e GRAF, R. localization of the mosquito insulin receptor homolog (MIR) in reproducing yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*). *J. Insect Physiol.* v.44, p.1127-1135, 1998.

HENRY, R.P. Multiple functions of crustacean gill carbonic anhydrase. *J. Exp.Zool.* v.248, p.19-24, 1988b.

HENRY, R.P. The subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crab. *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* v.245, p.1-8, 1988a.

HIGGINS, D.G. e SHARP, P.M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Computer Applications in the Biosciences.* v.5, n.2, p.151-153, 1989.

ISHIZAKI, H.; SUZUKI, A.; MORYA, I.; MIZOGUCHI, A.; FUJISHITA, M.; OOKA, H.; KATAOKA, H.; ISOGAI, A.; NAGASAWA, H. Prothoracatropic hormone bioassay pupal adult *Bombyx* assay (Prothoracatropic hormone -PTTH- *Bombyx mori* *Samia-Cyntia-ricini* pupal assay). *Dev. Growth differ.* v.25, p.593-600, 1983.

IWAMI, M.; FURUYA, I.; KATAOKA, H. Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression brain of the hornworm *Agrius convolvuli*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* v.26, p.25-32, 1996.

JAHN, P.J. *Efeito osmoprotetor da colina nas brânquias e hepatopâncreas do caranguejo Chasmagnathus granulata (Decapoda; Grapsidae) submetido ao estresse osmótico.* Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Departamento de Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

JONAS, E.A.; KNOX, R.J.; KACZMAREK, L.K.; SCHWARTZ, J.H.; SOLOMON, D.H. Insulin receptor in *Aplysia* neurons: characterization, molecular cloning, and modulation of ions currents. *J. Neurosci.* v.16, p.1645-1658, 1996.

KASSCHAU, M.R. SKISAK, C.M.; COOK, J.P.; MILLS, W.R. β -Alanine metabolism and high salinity stress en the sea anemone, *Bunodosoma canernata*. *J. Comp. Physiol.* v.154B, p.181-186, 1984.

KAWANO, T.; ITO, Y.; ISHIGURO, M.; TAKUWA, K.; NAKAJIMA, T.; KIMURA, Y. Molecular cloning and characterization of a new insulin / IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.273, n.2, p.431-436, 2000.

KIM, R.D.; STEIN, G.S.; CHARI, R.S. Impact of cell swelling on proliferative signal transduction in the liver. *J. Cell. Biochem.* v.83, p.56069, 2001.

KIMURA, K.D.; TISSENBAUM, H.A.; LIU, Y.; RUVKUN, G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. v.277, p.942-946, 1997.

KIMURA-KAWAKAMI, M.; IWAMI, M.; KAWAKAMI, A.; NAGASAWA, H.; SUZUKI, A.; ISHIZAKI, H. Structure and expression of bombyxin-related peptide genes of the moth *Samia cynthia ricini*. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.86,n.2, p.257-268, 1992.

KINNE, R.K.H. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. *J. Exp. Zool.* v.265, p.346-355, 1993.

KONRAD, C.; KRONER, A.; SPILLOTIS, M.; ZAVALA-GÓNGORA, R.; BREHM, K. Identification and molecular characterisation of a gene encoding a member of the insulin receptor family in *Echinococcus multilocularis*. *Intern. J. Parasitol.* v.33, p.301-312, 2003.

KROMER-METZGER, E.; LAGUEUX, M. Expression of the gene encoding an insulin-related peptide in *Locusta* (Insecta, Orthoptera). Evidence for alternative promoter usage. *Eur. J. Biochem.* v.221, p.427-434, 1994.

KUCHARSKI, L.C.; CAPP, E.; CHITTÓ, A.L.F.; TRAPP, M.; MARQUES, M.; DA SILVA, R.S.M. Insulin signaling: tyrosine kinase activity on the crab *Chasmagnathus granulata* gills. *J. Exp. Zool.* v.283, p. 91-94, 1999.

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

KUCHARSKI, L.C.; SCHEIN, V.; CAPP, E.; DA SILVA, R.S.M. In Vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.125, p.256-263, 2002.

KÜLTZ, D. e AVILA, K. Mitogen-activated protein kinases are in vivo transducers of osmosensory signals in fish gill cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* v.129, p.821-829, 2001.

LAGUEUX, M.; LWOFF, L.; MEISTER, M.; GOLTZENE, F.; HOFFMANN, J.A. cDNAs from neurosecretory-cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta, Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *Eur. J. Biochem.* v.187, p.249-254, 1990.

LANG, F.; BUSCH, G.L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HÄUSSINGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiological Reviews.* v.78, p.247-273, 1998.

LARDANS, V.; COPPIN, J.F.; VICOONE, J.; AROCA, E.; DELCROIX, M.; DISSOUS, C. Characterization of a insulin receptor-related receptor in *Biomphalaria glabrata* embryonic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1510, p.321-329, 2001.

LEIBUSH, B.N. e CHISTYAKOVA, O.V. Receptor of insulin-like growth factor 1 in tissues of the mollusc *Anodonta cygnea*. *J. Evol. Biochem. Physiol.* v.39, n.2, p.169-176, 2003.

LEROITH, D.; ADAMO, M.; SCHEMER, J.; WALDBILLIG, R.; LESNIAK, M.A.; DE PABLO, F.; HART, C.; ROTH, J.. Insulin-related materials in the nervous system of vertebrates and non-vertebrates: Possible extrapancreatic production. *Horm. Metabol. Res.*, v.20, p. 411-420, 1988.

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

MAÑE-GAZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B.H.; LEYMONTE, J. Estudios sobre la biología Del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. In: Osmoregulation frente a cambios de la salinidad. *Physis. Sección A.* v.33, n.86, p.163-171, 1974.

MANTEL, L.H. e FARMER, L.L. Osmotic and ionic regulation. In: BLISS, E.; MANTEL, L.H. (ed), *The Biology of Crustacea.* v.5, Academic Press, London, p. 53-161, 1983.

MANTEL, L.H. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. *Am. Zool.* v.25, p.253-263, 1985.

MARTINS, H. *Efeito da insulina sobre a atividade da enzima Na⁺ - K⁺ ATPase branquial, a síntese de proteína e captação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo e brânquias de Chasmagnathus granulata (Dana, 1851).* Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Departamento de Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

MATSUSHIMA, O. e YAMADA, A. Uptake of L and D-alanine by a brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, with special reference to their transport pathways and the salinity effect. *J. Exp. Zool.* v.263, p.8-17, 1992.

MCNAMARA, J.C.; SALOMÃO, L.C.; RIBEIRO, E.A. The effects of eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic concentration during acute salinity exposure in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Cruatacea, Decapoda). *Hydrobiologia.* v.199, p.193-200, 1990.

MÉNDEZ, E.; MONTSERRAT, N.; PLANAS, J. Modulation of the steroidogenic activity of luteinizing hormone by insulin and insulin-like growth factor-I through interaction with the cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in the trout ovary. *Molec. Cell. Endocrinol.* v.229, p.49-56, 2005.

MORENO, J.A. *Clima do Rio Grande do Sul*. Publicação da Secretaria de Agricultura do Estado do RGS. Diretoria de terras e colonização, secção de geografia. Porto Alegre, 1961.

MUGGEO, M.; GINSBERG, B. H.; ROTH, J.; NEVILLE, D.M.JR.; DE MEYTS, P.; KAHN, C.R. The insulin receptor in vertebrates is functionally more conservative during evolution than insulin itself. *Endocrinology*. v.104, p.1393-1402, 1979.

NAVARRO, I.; LEIBUSH, B.; MOON, T.W.; PLISETSKAYA, E.M.; BANOS, N.; MENDEZ, E.; PLANAS, J.V.; GUTIERREZ, J. Insulin, insulin like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. *Comp. Bioch. Physiol. B-Biochem & Mol. Biol.* v.122, p.137-153, 1999.

NISHIDA, Y.; HATA, M.; NISHIZUKA, Y.; RUTTER, W.J.; EBINA, Y. Cloning of a *Drosophila* cDNA encoding a polypeptide similar to the human insulin receptor precursor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.141, n.2, p.474-481, 1986.

OKUMA, E. e ABE, H. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. *Comp. Biochem. Physiol.* v.109A, n.1, p.191-197, 1994.

Ouwens, D.M.; Mesquita, D.S.G.; Dekker, J.; Maassen, J.A. Hyperosmotic stress activates the insulin receptor in CHO cells. *Bioch. Bioph. Acta.* v.1540, p97-106, 2001.

PÁRRIZAS, M.; PLANAS, J.; PLISETSKAYA, E.M.; GUTIÉRREZ, J. Insulin binding and receptor tyrosine kinase activity in skeletal muscle of carnivorous and omnivorous fish. *Am. J. Physiol.* v.266, p.1944-1950, 1994.

PÉQUEUX, A. e GILLES, R. Control of the extracellular fluid osmolality in crustaceans. In: PÉQUEUX, A.; GILLES, R.; BOLIS, L. (ed), *Osmoregulation in estuarine and marine animals*. Proc. 5th Conf. Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem. Taormina, Italy, p.17-34. *Lecturo Notes on Coastal and estuarine studies*, v.9, 1984.

PÉQUEUX, A. e GILLES, R. The transepithelial potential difference of isolated perfused gill of the chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater. *Comp. Biochem. Physiol.* v.88, p162-172, 1988.

PERTSEVA, M.N. e SHPAKOV, A.O. Conservatism of the insulin signaling system in evolution of invertebrate and vertebrate animals. *J. Evol. Biochem. Physiol.* v.38, n.5, p.547-561, 2002.

PETRUZZELLI, L.; HERRERA, R.; ARENAS-GARCIA, R.; FERNANDEZ, R.; BIRNBAUM, M.J.; ROSEN, O.M. Isolation of a *Drosophila* genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated *Drosophila* receptor with an anti-peptide anti-body. *Proc. Nat. Acad. Sci.* v.83, p. 4710-4714, 1986.

PIERCE, S.K. Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. *Biol. Bull. Mar.* v.163, p.405-419, 1982.

PILLET, S.C.; HENRY, R.; DOELLER, J.E.; KRAUSS, D.W. A comparison of the gill physiology of two euryaline crabs species, *Callinectes sapidus* e *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function as acclimation salinity. *J. Exp. Zool.* v.198, p.349-359, 1995.

PLANAS, J.V.; MÉNDEZ, E.; BAÑOS, N.; CAPILLA, E.; CASTILLO, J.; NAVARRO, I.; GUTIÉRREZ, J. Fish Insulin, IGF-I and IGF-II receptors: A phylogenetic approach. *Am. Zool.* v.40, p.223-33, 2000.

PLISETSKAYA, E.M.e DUAN, C.M. Insuli and insulin-like growth-factor-I in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* injected with streptozotocin. *Am. J. Physiol. Regulat. Integrat. Comp. Physiol.* v.257,n.5, p.R1408-R1412, 1994.

PORTE Jr., D.; BASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M.W. Insulin signaling in the central nervous system. *Diabetes.* v.54, p.1264-1276, 2005.

RICHARDSON, N.A.; ANDERSON, A.J.; SARA, V.R. The effects of insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* v.105, p.287-293, 1997.

ROOVERS, E.; VINCENT, M.E.; VANKESTEREN, E.; GERAERTS, W.P.M.; PLANTA, R.J.; VREUGDENHIL, E.; VANHEERIKHUIZEN, H. Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene.* v.162, n.2, p.181-188, 1995.

RULIFSON, E.J.; KIM, S.K.; NUSSE, R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science.* v.296, p.1118-1120, 2002.

SALTIEL, A.R. e KAHN, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* v.413, p.799-806, 2001.

SANDERS, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. I. Insulin immunoreactivity. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.50, p.366-373, 1983a.

SANDERS, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . II. Insulin-like biological activity. *Gen. Comp. Endocrinol.* v.50, p.374-377, 1983b.

SANDERS, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . III. No glucostatic role. *Gen. Comp. Endocrinol.* V.50, p.378-382, 1983c.

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

SANVITTO, G.L. *Estudo Filogenético dos receptores cerebrais para insulina*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1992.

SATAKE, S.; MASUMURA, M.; ISHIZAKI, H.; NAGATA, K.; SUZUKI, A.; MIZOGUCHI, A. Bombyxin and insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem Mol. Biol.* v.118, p.349-357, 1997.

SCATCHARD, G. The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sc.* v.51, p.660-667, 1949.

SCHÄCKE, H.; MULLER, W.E.G., GAMULIN, V.; RINKEVICH, B. The IG superfamily includes members from the lowest invertebrates to the highest vertebrates. *Immunology Today.* v.15, n.10, p.497-498, 1994.

SCHEIN, V.; CHITTÓ, A.L.F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R.S.M. Effects of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.B.* v.140, p.561-567, 2005.

SKOROKHOD A, GAMULIN V, GUNDACKER D, KAVSAN V, MULLER IM, MULLER WEG. Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biological Bulletin.* v.197, n.2, p.198-206, 1999.

SMIT, A.B.; VANKESTEREN, R.E.; LI, K.W.; VANMINNEN, J.; SPIJKER, S.; VANHEERIKHUIZEN, H.; GERAERTS, W.P.M. Towards understanding the role of insulin in the brain: Lessons from insulin-related signaling systems in the invertebrate brain. *Progress in Neurobiology,* v.54, n.1, p.35-54, 1998.

STEEL, J.E. occurrence of hyperglycaemic factor in corpus cardiacum of an insect. *Nature.* V.192, p.680-681. 1961

STEELE, R.E.; LIEU, P.; MAI, N.H.; SHENK, M.A.; SARRAS, M.P. Response to insulin and the expression pattern of a gene encoding an insulin receptor homologue suggest a role for an insulin-like molecule in regulating growth and patterning in *Hydra*. *Development Genes and Evolution.* v.206, n.4, p.247-259, 1996.

TATAR, M.; KOPELMAN, A.; EPSTEIN, D.; TU, M.P.; YIN, C.M. GAROFALO, R.S. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science.* v.292, p.107-110, 2001.

TOMÁS, E.; ZORZANO, A.; RUDERMAN, N.B. Exercise effects on muscle insulin signalling and action exercise and insulin signaling: a historical perspective. *J. Appl. Physiol.* v.93, p.765-772, 2002.

TRAPP, M. *Autofosforilação do receptor e transdução do sinal da insulina em brânquias de caranguejos Chasmagnathus granulata adaptados a diferentes dietas e ao jejum*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia)-Departamento de Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

TURCATO, G.O. *Estudo bioecológico do caranguejo do estuário Chasmagnathus granulata Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil*. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia).Departamento de Zoologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

TURYN, D.; DA SILVA, R.S.M.; MARQUES, M.; DELLACHA, J.M. Characterization of insulin-binding sites in turtle thyroid microsomes. *J. Endocrinol.* v.108, p. 157-162, 1986.

ULRICH, K. cap 3 The structural variety and metabolism of proteins e cap 13 The structure and metabolism of carbohydrates. In: *Comparative Animal Biochemistry*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990.

VANDEN B.J. Neuropeptides and their precursors in the fruitfly, *Drosophila melanogaster*. *Peptides*. v.22, p.241-254, 2001.

VANFLETEREN, J.R. e BRAECKMANS, B.P. Mechanism of life span determination in *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiol.* v.20, p.487-502, 1999.

VICOONE, J.; PIN, J-P.; LARDANS, V.; CAPRON, M.; NOËL, C.; DISSOUS, C. An unusual receptor tyrosine kinases of *Schistosoma mansoni* contain a venus flytrap module. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.126, p.51-62, 2003.

WELLCOMME, L. e DEVOS, P. Energy consumption in the perfused gills of the crab euryhaline *Eriocheir sinensis* adapted to freshwater. *J. Exp. Zool.* v.257, p.150-159, 1991.

WELLCOMME, L. e DEVOS, P. Immunological identification and biochemical characterization of glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas* (L). *J. Exp. Zool.* v.268, p. 218-223, 1994.

WHITE, M.F. e KAHN, C.R. The insulin signaling system. *J. Biol Chem.* v. 269, p.1-4, 1994.

WHITNEY, J.O. The effects of external salinity upon lipid synthesis in the crab *Callinectes sapidus* Rathbun and in the spider crab *Libinia emarginata* Leech. *Comp. Biochem. Physiol.* v.49, p.433-440, 1974.

WÜRDIG, N.L. *Ostracodes do Sistema Lagunar de Tramandaí, RS, Brasil, Sistemática, Ecologia e Subsídios à Paleoecologia*.: Tese (Doutorado em

Paleontologia) - Curso de Pós-Graduação em Geociências, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984.

YAMAGUCHI, T.; FERNANDEZ, R.; ROTH, R.A.. Comparison of the signaling abilities of the drosophila and human insulin receptors in mammalian cells. *Biochemistry*. v.34, p.4962-4968, 1995.

LISTA DE TRABALHOS

A presente Tese de Doutorado permitiu a seguinte produção:

1. Trabalhos submetidos para publicação

TRAPP, M., SCHEIN, V., WACHÉ, Y., PÖPPL, A., CAPP, E., KUCHARSKI, L.C., FAVREL, P., VAN WORMHOUDT, A., DA SILVA, R.S.M. Characterization of insulin receptors in gills from crabs submitted to hyperosmotic stress. *Febs Letters*. v. Submitted, 2005.

TRAPP, M., PÖPPL, A., CAPP, E., KUCHARSKI, L.C., DA SILVA, R.S.M. Effect of hypo-osmotic condition on insulin- receptor characteristics on the posterior gills of the crab *Chasmagnathus granulata*. *J. Exp. Zool.* v. Submitted, 2005.

TRAPP, M., PÖPPL, A., CAPP, E., KUCHARSKI, L.C., DA SILVA, R.S.M. Anterior gills insulin receptor-like of *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hypo- and hyperosmotic stress. *Gen. Comp. Endocrinol.* v. Submitted, 2005.

2. Trabalhos apresentados em congressos

Marqueze, A.; Trapp, M.; Kucharski, L.C.; Da Silva, R.S.M. Efeito da anoxia e da fase de recuperação da anoxia sobre a via glicolítica em *Chasmagnathus granulata* mantidos com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP). XVII Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE). Salvador, BA, 2002.

Trapp, M.; Pöppel, A.; Kucharski, L.C.; Da Silva, R.S.M. Atividade tirosina quinase do receptor à insulina e captação de 2-deoxi-glicose-¹⁴C em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* submetido ao estresse hiperosmótico. XIX Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE). Águas de Lindóia, SP, 2004.

Bock, C.; Mammarella, L.; Trapp, M.; Kucharski, L.C.; Da Silva, R.S.M. Efeito do estresse osmótico, *in vitro*, sobre a síntese de proteínas em tecidos do caranguejo *C. granulata*. XIX Federação das Sociedades de Biologia Experimental (FESBE). Águas de Lindóia, SP, 2004.