

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão



**ANA LÚCIA FERNANDES CHITTÓ**

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Kucharski

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, 2005

*Aos meus pais e ao meu marido,  
pelo incentivo à minha formação e pelo carinho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer especialmente aos meus orientadores, Professora Dra. Roselis Silveira Martins da Silva e Professor Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski, pela acolhida em seu laboratório, pela dedicada orientação, pelo valioso auxílio nos experimentos e pelos seus diversos ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos meus familiares, principalmente ao meu pai e à minha mãe, pela paciência e compreensão, pelo carinho e incentivo à minha formação.

Ao meu marido Elton, pela compreensão, companheirismo, paciência, carinho e incentivo.

Às amigas do laboratório, Vanessa e Márcia, pelo companheirismo, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Capp pelo seu bom humor e incentivo.

À Professora Dra. Ana Battastini e à Alessandra Tamajusuku pelos seus ensinamentos e pela recepção acolhedora em seu laboratório no Departamento de Bioquímica.

A todos os colegas de laboratório, pelo grande companheirismo.

Às amigas Alice e Rita, pelo indispensável auxílio técnico.

Aos alunos de Iniciação Científica, especialmente ao Rodrigo, pelo auxílio nos experimentos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação, pela convivência agradável ao longo deste trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pelos ensinamentos.

Às funcionárias da secretaria do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela ajuda durante o desenvolvimento do curso.

Aos funcionários e professores do Departamento de Fisiologia, pela convivência durante este período.

À CAPES, CNPq e FAPERGS pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
OBJETIVO GERAL .....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
1. ANIMAIS .....	32
<b>1.1. Coleta e manutenção dos animais</b> .....	<b>33</b>
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	34
3. DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	34
<b>3.1. Determinação dos lipídios totais</b> .....	<b>35</b>
<b>3.2. Gliconeogênese a partir de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol</b> .....	<b>35</b>
<b>3.3. Atividade das enzimas FBFase e G6Fase</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4. Dosagem de proteína</b> .....	<b>40</b>
4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	40
<b>TRABALHOS DESENVOLVIDOS</b> .....	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>42</b>
Variação sazonal da atividade gliconeogênica nas brânquias e da concentração de lipídios totais em tecidos de caranguejos <i>Chasmagnathus granulatus</i> aclimatados às condições hiperosmóticas.....	42
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>67</b>
Efeito do estresse hiposmótico sobre a gliconeogênese em brânquias e sobre a concentração de lipídios totais na hemolinfa e nos tecidos de <i>C. granulatus</i> : no inverno e no verão.....	67
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>88</b>
Atividade das enzimas glicose-6-fosfatase e frutose 1,6 bifosfatase em tecidos do caranguejo <i>Chasmagnathus granulatus</i> : efeito do estresse osmótico .....	88
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>106</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>109</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

Asp – aspartato

ba – brânquia anterior

bp – brânquia posterior

CGIRLTK - região tirosina quinase do receptor de insulina de *C. granulatus* (*C. granulatus* insulin receptor-like tyrosine kinase)

CHH - hormônio hiperglicêmico de crustáceos

DHAF - diidroxiacetona fosfato

FBFase - frutose-1,6-bifosfatase

G6Fase - glicose-6-fosfatase

MeAIB - ácido metil-aminoisobutírico

OAA - oxalacetato

PC - piruvato carboxilase

PEP - fosfoenolpiruvato

PEPCK - fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PMSF - fenilmetilsufonil fluoride

RVD - regulação para diminuição do volume celular (regulatory cell volume decrease)

RVI - regulação para aumento do volume celular (regulatory cell volume increase)

SFC - solução fisiológica de caranguejo

TMAO - óxido de trimetilamina

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo verificar o efeito do estresse osmótico sobre a via gliconeogênica a partir de glicerol em brânquias e sobre a concentração de lipídios totais em diferentes tecidos de *Chasmagnathus granulatus*, no inverno e no verão, bem como a atividade das enzimas gliconeogênicas glicose-6-fosfatase (G6Fase) e frutose 1,6-bifosfatase (FBFase). Foram determinadas as concentrações de lipídios totais em brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP), hepatopâncreas, músculo da quela e hemolinfa de animais do grupo controle (20‰) ou submetidos a 1, 3 e 6 dias de estresse hipo (0‰) ou hiperosmótico (34‰) no inverno e no verão. Em BPs a concentração de lipídios totais foi maior do que nas BAs de inverno e verão. No hepatopâncreas, durante o estresse hiperosmótico, a concentração de lipídios foi maior no inverno do que no verão. No verão, a concentração de lipídios totais diminuiu nas BPs, no hepatopâncreas e no músculo durante o estresse hiperosmótico, sugerindo que os lipídios estão sendo utilizados como substrato energético durante a aclimatação ao estresse. O aumento da concentração de lipídios totais nas brânquias e no hepatopâncreas sugere a participação da lipogênese no ajuste metabólico ao estresse hiposmótico no inverno. A formação de glicose foi determinada a partir de [<sup>14</sup>C] - glicerol-, *in vitro*, em BAs e BPs de animais do grupo controle ou submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico de 1, 3 e 6 dias no inverno e no verão. A gliconeogênese em BAs e BPs do grupo controle foi maior no verão do que no inverno. No verão, no grupo controle, a gliconeogênese das BPs foi maior do que aquela das BAs. A diminuição da capacidade gliconeogênica das brânquias durante diferentes tempos de estresse hiperosmótico sugere a participação desses tecidos no ajuste metabólico ao estresse. Durante o estresse hiposmótico, o glicerol parece não ser o substrato preferencial utilizado por essa dessa via tanto no verão como no inverno. A atividade das enzimas G6Fase e FBFase foi determinada em BAs e BPs, hepatopâncreas e músculo da mandíbula de animais do grupo controle ou submetidos a 3 dias de estresse hipo ou hiperosmótico nos meses de verão. A atividade da G6Fase e da FBFase no grupo controle foi mais elevada no hepatopâncreas do que nos outros tecidos. As atividades dessas enzimas confirmam que a via gliconeogênica é completa nos tecidos estudados. O efeito do estresse hipo ou hiperosmótico, *in vivo*, sobre a atividade das enzimas varia conforme o tecido do caranguejo.

## INTRODUÇÃO

As variações extremas dos fatores ambientais, em estuários, exercem um controle seletivo e severo sobre as espécies que habitam essas áreas. Mudanças tanto comportamentais como estruturais e funcionais ocorrem nos organismos lacustres e estuarinos, capacitando-os a tolerar as alterações frequentes das características físico-químicas do meio (Kinne, 1993). Os seres vivos que vivem em ambientes aquáticos com grande flutuação de salinidade, constantemente sofrem alterações no volume celular devido à perda ou ao ganho de água (Yancey et al., 1982).

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinho e límnic, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura de água e outros de completa exposição do substrato. Esses ecossistemas, que constantemente sofrem a influência de fatores oceanográficos, límnicos e meteorológicos, impõem à sua boita um elevado estresse ambiental. O estresse pode ser gerado tanto pelas variações extremas de fatores como salinidade e temperatura, bem como pela concentração de O<sub>2</sub> dissolvido no meio e pelos ciclos das marés (Odum, 1985).

Considerando-se as variações na concentração osmótica dos fluidos corporais dos organismos aquáticos em resposta às variações de salinidade do meio, distinguem-se duas formas de ajustes osmóticos: osmoconformação e osmorregulação. Nas espécies osmoconformadoras, a pressão osmótica intracelular pode variar de acordo com a variação da osmolalidade do meio, ou seja, esses animais mantêm a osmolalidade dos seus fluidos corporais semelhantes àquela do meio em que se encontram. As espécies osmorreguladoras são capazes de tolerar variações na salinidade do meio com mínimas

alterações da concentração osmótica da hemolinfa (Péqueux, 1995, Schmidt-Nielsen, 2002).

Entre os crustáceos decápodes, encontram-se desde animais marinhos estenoalinos com pouca ou nenhuma capacidade osmorreguladora, portanto, tolerantes a pequenas variações de salinidade, até animais estuarinos eurialinos tolerantes a grandes variações de salinidade no meio e com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa. Nos crustáceos eurialinos, a osmolaridade do fluido extracelular pode variar em função da osmolaridade do meio ambiente (Huggins e Munday, 1968; Mantel e Farmer, 1983; Péqueux, 1995, Schmidt-Nielsen, 2002).

Está bem documentado na literatura que, em áreas estuarinas e intertidais, as flutuações constantes de salinidade impõem um estresse iônico à sua biota. Essas variações de salinidade induzem mudanças na composição orgânica e inorgânica dos fluidos corporais dos organismos de estuários e marinhos intertidais, exigindo desses animais ajustes homeostáticos compensatórios (Kasschau et al, 1984; Matsushima e Hayashi, 1992; Bishop e Burton, 1993; Okuma e Abe, 1994; Pillet et al., 1995). A aquisição da capacidade osmorreguladora desempenhou um importante papel na conquista de novos habitats por esses animais (Péqueux, 1995).

O caranguejo *C. granulatus* pode ser classificado como eurialino, uma vez que suporta uma ampla variação de salinidade e como um regulador hiper-hiposmótico, apresentando hemolinfa hiposmótica em meio concentrado (40‰) e hemolinfa hiperosmótica em meio diluído (0‰ a 20‰) (Mañe-Gazon et al., 1974). Seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e no verão, respectivamente (Bromberg, 1992). Cervino et al. (1996) demonstraram que caranguejos *C. granulatus* adaptados durante 45 dias às salinidades de 7, 12, 20 ou 34 ‰ e submetidos a um experimento onde tinham liberdade de escolher uma entre estas quatro salinidades,

optavam pela salinidade mais elevada, quando tinham sido previamente aclimatados à salinidade de 20 ou 34‰. Entretanto, aqueles animais aclimatados a baixas salinidades não apresentaram nenhuma preferência estatisticamente significativa.

Segundo Gilles (1982), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: (1) regulação anisosmótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolaridade da hemolinfa independente da osmolaridade do meio externo; (2) regulação isosmótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolaridade do fluido intracelular e do volume celular, com o objetivo de mantê-lo isosmótico em relação ao fluido extracelular.

A regulação isosmótica do fluido intracelular implica em duas fases: (1) compreende respostas imediatas de alteração do volume celular, como consequência de choques osmóticos, e envolve a plasticidade da membrana plasmática; (2) está relacionada com eventos de influxo e efluxo de efetores osmóticos, tanto orgânicos (aminoácidos livres) como inorgânicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ) (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997). Entre os efetores inorgânicos, o íon  $\text{K}^+$  é essencialmente importante durante os choques hipo-hiperosmótico, pois limita a alteração do volume celular em invertebrados eurialinos (Gilles, 1987; Gilles, 1997). Contudo, os efetores orgânicos são considerados como principais responsáveis pelo reajuste do volume celular durante alterações osmóticas do meio extracelular (Gilles e Delpire 1997; Gilles, 1997).

Os principais osmólitos orgânicos em eucariotos, que vivem em ambiente aquático estressante, estão restritos a uma pequena classe de moléculas com baixo peso molecular: polióis (ex. glicerol, manitol e sacarose); aminoácidos livres e derivados de aminoácidos (ex. taurina, glicina e glutamina); uréia e metilaminas (ex.: óxido de trimetilamina - TMAO, betaína e sarcosina) (Yancey et al., 1982). A importância da sua função como efetor osmótico depende da espécie estudada. Em invertebrados e em

vertebrados de água doce, com exceção dos agnatas e dos celacantos, a osmolaridade extracelular é geralmente baixa: 280-359 mOsm/L. Os íons inorgânicos contribuem com aproximadamente 200-300 mOsm/L e os osmólitos orgânicos de baixo peso molecular com 50-100 mOsm/L. Em invertebrados marinhos ou em peixes primitivos a osmolaridade é aproximadamente três vezes mais alta. Em animais com osmolaridade extracelular de 1000 mOsm/L, aproximadamente 200-300 mOsm/L são de íons inorgânicos e o restante (700-800 mOsm/L) de diferentes osmólitos orgânicos, como os compostos nitrogenados e polióis. Entretanto, a concentração intracelular dos osmólitos inorgânicos permanece quase inalterada mesmo que ocorram grandes variações nas concentrações extracelulares (Gilles e Delpire 1997; Gilles, 1997).

Em mamíferos, a exposição de células a um meio anisomótico tem sido utilizada para estudos da regulação do volume celular. Células submetidas de forma súbita ao meio hiposmótico incharam de modo semelhante à osmômetros, e dentro de minutos retornaram ao seu volume original. Este comportamento foi denominado regulação para diminuição do volume celular (*regulatory cell volume decrease* – RVD). Inversamente, a exposição súbita ao meio hiperosmótico levou a redução do volume celular e as células murcharam de modo semelhante a osmômetros. Após alguns minutos ocorreu uma regulação para aumento do volume celular (*regulatory cell volume increase* – RVI), o que levou o volume regulatório próximo aos valores iniciais. Os mecanismos responsáveis pelo RVD e RVI podem diferir entre os diferentes tipos celulares, mas, em geral, envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons na membrana plasmática. Contudo, esses mecanismos não restabelecem completamente os volumes celulares e as células permanecem levemente murchas ou levemente entumecidas. Foi proposto que esta pequena variação atue como sinal indutor para

ativação ou inibição dos processos metabólicos celulares (Häussinger et al., 1994; Lang et al., 1998; Schliess e Häussinger, 2002).

O aumento do volume celular pode produzir como RVD um sinal anabólico, pois estimula a síntese de proteínas, de glicogênio e, em menor grau, de lipídios em mamíferos. Além disso, protege a célula contra danos oxidativos e contra danos causados por aquecimento. Já a redução do volume celular leva ao catabolismo para ativar a RVI, aumentando a proteólise, a glicogenólise e a gliconeogênese, contribuindo para a resistência à insulina e aumenta a suscetibilidade da célula aos danos causados pelo estresse (Lang et al., 1998; Schliess e Häussinger, 2002).

Mudanças na concentração de osmólitos orgânicos no fluido extracelular influenciam diretamente as vias metabólicas, pois alteram o fluxo de substratos para as células. Desta forma, altera a concentração de hormônios e outras moléculas sinalizadoras, estimulando ou inibindo a expressão de genes que codificam proteínas reguladoras ou enzimas chave do metabolismo intermediário. Essas alterações metabólicas estão diretamente relacionadas com as adaptações fisiológicas necessárias à sobrevivência das células às alterações no meio extracelular (Schliess e Häussinger, 2002).

O metabolismo dos compostos nitrogenados estaria envolvido na resposta fisiológica ao estresse osmótico, atuando através de modificações na síntese e na degradação de proteínas em aminoácidos livres, no transporte desses aminoácidos pelas membranas plasmáticas e na renovação de proteínas que serviriam como reservas desses aminoácidos (Schoffeniels, 1976; Gilles, 1982; Gilles e Delpire, 1997). A partir de estudos realizados em invertebrados, Gilles (1982) propôs que durante o ajuste homeostático ao estresse osmótico ocorreriam mudanças na concentração dos aminoácidos livres tissulares, os quais seriam utilizados em três mecanismos básicos:

(1) deslocamento do equilíbrio entre influxo e efluxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; (2) alterações na oxidação dos aminoácidos tissulares; (3) alterações na síntese e/ou degradação de proteínas.

A literatura descreve que o estresse osmótico em invertebrados marinhos ou estuarinos altera a concentração dos aminoácidos livres intracelulares. A concentração de aminoácidos não-essenciais, como, por exemplo, a glicina, a prolina e a alanina, após mudanças ambientais de salinidade, pode variar de 0,1 a 0,2 M em crustáceos marinhos. Assim, os aminoácidos livres aliados a compostos nitrogenados como o óxido de trimetilamina e a betaína, perfazem 50 a 60% dos efetores osmóticos nesses animais. Em crustáceos eurialinos, a concentração de aminoácidos livres tissulares é cerca de 10 vezes maior do que aquela dos tecidos de mamíferos, enquanto que os níveis hemolinfáticos são equivalentes (Huggins e Munday, 1968; Gilles, 1997). Está descrito na literatura que a arginina, a alanina, a prolina, o ácido glutâmico e a taurina são os mais importantes efetores osmóticos orgânicos. Entretanto, a contribuição relativa de cada aminoácido no ajuste osmótico pode variar entre as espécies e entre os diversos tecidos de uma mesma espécie (Huggins e Munday, 1968; Bowlus e Somero, 1979; Chang e O'Connor, 1983; Mantel e Farmer, 1983; Bishop e Burton, 1993).

Em *C. granulatus* mantidos em salinidade de 20‰, a determinação de aminoácidos livres na hemolinfa revelou a presença de aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo a glicina, a serina, a arginina, a alanina e a prolina os mais abundantes. Durante o estresse hiperosmótico a concentração de glicina na hemolinfa diminuiu 60% (Schein, 1999).

Durante o estresse hiposmótico, *in vivo*, a oxidação total de aminoácidos não estaria envolvida na diminuição da concentração de aminoácidos intracelulares em hepatopâncreas e músculo mandibular de *C. granulatus*. Entretanto, durante o estresse

hiperosmótico, a redução da oxidação de [<sup>14</sup>C]- alanina parece ser um dos mecanismos implicados no aumento da concentração de aminoácidos livres intracelulares no hepatopâncreas (Schein et al. 2005b). Bock (2005) verificou que a síntese de proteínas, a captação e a oxidação de aminoácidos parecem estar envolvidos no aumento ou diminuição da concentração de aminoácidos intracelulares em hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico agudo *in vitro*. A autora constatou no estresse hiposmótico um aumento na síntese de proteínas em todos os tecidos estudados, exceto nas brânquias anteriores; e no estresse hiperosmótico uma redução da síntese de proteínas em todos os tecidos. Durante o estresse hiposmótico a diminuição na captação de aminoácidos via sistema A e o aumento na oxidação total da [<sup>14</sup>C]-L-leucina foram empregados como mecanismo para reduzir os níveis intracelulares de aminoácidos em brânquias posteriores e anteriores, respectivamente. Nenhum dos tecidos mostrou capacidade de mobilização de proteínas sintetizadas a partir de [<sup>14</sup>C]-leucina durante os diferentes estresses.

Durante o estresse hiperosmótico de 3 dias foi constatado aumento da captação de colina no hepatopâncreas de *C. granulatus* e da síntese de glicina betaína com função osmo-protetora. Entretanto, em brânquias, não houve variação significativa de formação de glicina-betaína, sugerindo a utilização de outros substratos para a osmorregulação (Jahn, 2001).

Diversos estudos em diferentes espécies de crustáceos decápodes sugerem um controle neuroendócrino sobre o mecanismo osmorregulatório. Eckhardt et al. (1995) verificaram a presença de um peptídeo na glândula do seio com participação no controle neuroendócrino da osmoregulação em *Pachygrapsus marmoratus*. Pierrot et al. (2000) trabalhando com o mesmo caranguejo eurialino, aclimatado à água diluída, perfundiram

as brânquias posteriores isoladas com o hormônio hiperglicêmico de crustáceos (CHH) obtido da glândula do seio. O CHH aumentou a diferença do potencial transepitelial e o influxo de  $\text{Na}^+$  em 50% nestes órgãos, sugerindo a participação desse neuropeptídeo como o fator mais importante no controle da osmorregulação em crustáceos decápodes.

Charmantier-Daures (1994) demonstrou que uma isoforma de CHH estaria envolvida no processo de hiperosmorregulação em *H. americanus* aclimatado a baixa salinidade. Soyez et al. (1994) identificaram esta isoforma de CHH como sendo o peptídeo D-Phe<sup>3</sup> CHH. Chung et al. (1999) também observaram uma ação direta de um peptídeo semelhante ao CHH sobre os mecanismos de osmorregulação no caranguejo *Carcinus maenas*.

Serrano et al. (2003) isolaram três diferentes isoformas de CHH (10SGe<sub>qiv</sub>: Z1, Z2 e Z3) de *Astacus leptodactylus* extraídas da glândula do seio, e as injetaram em animais apedunculados. Os autores verificaram que a isoforma D-Phe<sup>3</sup> (Z3) causou aumento da osmolalidade da hemolinfa e da concentração de  $\text{Na}^+$ , enquanto as demais isoformas aumentaram somente a concentração de  $\text{Na}^+$  hemolinfático. Este trabalho mostrou, pela primeira vez, em crustáceo aclimatado à água doce, os efeitos das isoformas de CHH sobre a osmorregulação.

Em *C. granulatus*, o estresse hiposmótico aumenta os valores de glicose circulante (Da Silva e Kucharski, 1992). Vinagre (1999) constatou que a ablação bilateral dos pedúnculos oculares não alterou a resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico em *C. granulatus*. A autora sugere a possibilidade de envolvimento de outros hormônios, de monoaminas, ou de isoformas de CHH produzidas fora da glândula do seio do pedúnculo ocular que agiriam aumentando os níveis circulantes de glicose durante o estresse hiposmótico.

Kucharski et al. (1997) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, a presença de receptores à insulina em brânquias do caranguejo *C. granulatus*. Estes receptores apresentam propriedades semelhantes às aquelas observadas em receptores de insulina em tecidos-alvo clássicos de vertebrados (Kucharski et al., 1997) e pertencem à família tirosina quinase como os receptores de mamíferos (Kucharski et al., 1999). Estes autores sugerem que no *C. granulatus* a transdução do sinal da insulina em células branquiais é similar àquela de mamíferos: ligação do hormônio à subunidade  $\alpha$ , autofosforilação da subunidade  $\beta$ , fosforilação de proteínas citoplasmáticas. Recentemente, foi realizada a clonagem parcial da região tirosina quinase do receptor de insulina (*C. granulatus* insulin receptor-like tyrosine kinase – CGIRLTK, GenBank-DQ104214 ) a partir do tecido branquial de *C. granulatus* (Trapp et al., 2002). A administração de insulina de mamífero durante 8 dias em *C. granulatus* aumentou significativamente a atividade da enzima  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  e a captação de aminoácidos nas brânquias posteriores (Martins, 2003). No hepatopâncreas este hormônio também estimulou a captação de  $^{14}\text{C}\text{-MeAIB}$  (ácido metil-aminoisobutírico), contudo, não apresentou efeito significativo sobre a síntese de proteínas em hepatopâncreas, músculo, brânquias anteriores e posteriores (Martins, 2003). Estes dados sugerem a participação da insulina no processo de osmorregulação em *C. granulatus*.

Recentemente, Trapp et al. (2004) demonstraram redução na concentração, afinidade e atividade tirosina quinase do receptor de insulina em brânquias posteriores de *C. granulatus* submetido ao estresse hiperosmótico durante 6 dias.

Os estudos sobre o metabolismo intermediário em crustáceos têm mostrado variabilidades inter e intra-espécies, devido às peculiaridades biológicas e ecológicas destes animais, o que torna difícil a generalização. Tais peculiaridades podem ser

atribuídas a múltiplos fatores, como o habitat (terrestre, marinho, estuarino ou de água doce), ciclo da muda, maturidade sexual, estado e hábito alimentar.

A glicose, principal monossacarídeo na hemolinfa de crustáceos, apresenta flutuações marcantes, dependendo do estágio da muda, da estação do ano, da dieta oferecida, do estado alimentar, do ciclo circadiano e da concentração do hormônio hiperglicemiante, entre outros fatores (Chang e O'Connor, 1983; Morris e Airriess, 1998). Nos crustáceos, a glicose tem cinco destinos principais: síntese de mucopolissacarídeos, síntese de quitina, síntese de ribose e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), formação de piruvato e síntese de glicogênio (Hochachka et al., 1970; Herreid e Full, 1988).

Os principais lipídios de crustáceos são os lipídios neutros, entre estes, 90% são triglicerídios (Gilbert e O'Connor, 1970; Allen et al., 2000). Os lipídios de crustáceos são transportados na hemolinfa por lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Garcia et al., 2002). Há diversos estudos sobre o metabolismo de lipídios nesses animais, mas a maioria trata da utilização das reservas de lipídios durante a embriogênese e o período reprodutivo (Sibert et al., 2004; Rosa et al., 2005; Calado et al., 2005; Rosa e Nunes, 2003). O hepatopâncreas parece ser o principal órgão de reserva e fornecedor de lipídios para o período reprodutivo (Jeckel et al., 1991; Hasek e Felder, 2005).

Estudos também revelam os efeitos da variação sazonal, da concentração de oxigênio no meio, da composição da dieta e do jejum sobre as reservas de lipídios. No krill *E. crustallorophias* os níveis de lipídios são mais baixos no inverno do que no verão (Nicol et al., 2004). Camarões *N. gracilis*, que vivem há 1000 metros de profundidade onde a concentração de oxigênio é mínima, possuem triglicerídios como sua maior reserva lipídica (Allen et al., 2000). O caranguejo decápode *P. granulosa* apresenta um padrão diferenciado de adaptação ao jejum. Inicialmente utilizam

proteínas como reserva energética e após os lipídios totais (Comoglio et al., 2005). O efeito do jejum longo e da realimentação foi verificado em uma espécie de crustáceo hipógeno e em uma espécie epígena por Hervant e Renault (2002). A espécie epígena apresentou uma diminuição de todas as suas reservas energéticas ao longo do jejum, enquanto a espécie hipógena apresentou três fases catabólicas (glicídica, lipídica e proteo-lipídica) ao longo do período de restrição alimentar e uma rápida recuperação de suas reservas energéticas quando realimentados. Os autores sugerem que estas respostas adaptativas são utilizadas por várias espécies subterrâneas como estratégias para sobrevivência em ambientes onde há períodos de restrição alimentar e/ou de oxigênio.

Em *C. granulatus* alimentado com dieta rica em proteínas, Vinagre e Da Silva (2002) verificaram que o glicogênio hepatopancreático e muscular parece ser o principal substrato energético utilizado durante o jejum curto. Entretanto, ao final do período de jejum de 8 semanas, os lipídios do hepatopâncreas e do músculo seriam a fonte adicional de energia tanto em animais alimentados previamente com dieta rica em proteínas como rica em carboidratos (Vinagre e Da Silva, 1992).

Em *C. granulatus* o jejum de 3 semanas não alterou a síntese de lipídios no hepatopâncreas, músculo e brânquias (Vinagre e Da Silva, 2002). Contudo, em caranguejos submetidos a 3 semanas de jejum e 48 horas de realimentação ocorreu uma elevação da síntese de lipídios no hepatopâncreas.

Ao investigarem o efeito da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário em *C. granulatus*, Kucharski e Da Silva (1991a) verificaram que no hepatopâncreas e no músculo as maiores concentrações de glicogênio ocorrem no outono e no inverno, diminuindo na primavera e no verão. A maior reserva de lipídios no músculo ocorre no verão e diminui no outono e inverno, enquanto as reservas de lipídios do hepatopâncreas são significativamente elevadas, cerca de 20% do peso do órgão,

diminuindo somente no outono. Os autores sugerem que o glicogênio estocado no hepatopâncreas e no músculo seria consumido como substrato energético durante os meses de primavera e verão. Já no outono e no inverno, a reserva de lipídio muscular seria o principal substrato energético.

Kucharski e Da Silva (1991 b) verificaram em *C. granulatus* alimentado com uma dieta rica em proteínas um aumento de cerca de 30% na concentração de lipídios totais no hepatopâncreas quando comparada com os animais do campo e alimentados com uma dieta rica em proteínas.

O envolvimento do metabolismo intermediário durante o processo de aclimação ao estresse hipo e hiperosmótico em *C. granulatus* já foi estudado. Santos e Nery (1987) encontraram alterações dos níveis de glicose na hemolinfa de caranguejos *C. granulatus*, quando submetidos a diferentes salinidades. Em caranguejos aclimatados a salinidade de 30‰ e depois expostos a uma salinidade de 10‰ ou 20‰ não foram constatadas alterações significativas nos valores de glicose hemolinfática. Já os animais aclimatados a 30‰ de salinidade e após submetidos ao estresse hiposmótico (0‰), por diferentes tempos, apresentaram às 72 horas valores de glicose na hemolinfa próximos de zero mg/mL. As concentrações de glicose foram restabelecidas somente após 168 horas de estresse osmótico. Nos animais aclimatados a uma salinidade de 30‰ e após submetidos à concentração salina de 40‰, os níveis de glicose na hemolinfa atingiram valores nulos e permaneceram assim até o final do período experimental. Esses autores sugerem que o *C. granulatus* aclimata-se melhor ao estresse hiposmótico do que ao hiperosmótico.

A composição da dieta a qual o *C. granulatus* foi alimentado antes de iniciar o estresse hiposmótico, também altera a resposta do metabolismo de carboidratos durante o processo de aclimação ao meio. Da Silva e Kucharski (1992), estudando o efeito da

composição da dieta sobre a adaptação ao estresse hiposmótico em *C. granulatus*, verificaram uma diminuição significativa dos níveis de glicogênio no músculo em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos. Nesse mesmo estudo, os autores constataram, nos caranguejos alimentados com uma dieta rica em proteínas, um aumento significativo dos níveis de glicogênio hepatopancreático no 3º dia de estresse hiposmótico, entretanto, nenhuma variação significativa da concentração deste polissacarídeo foi constatada no músculo.

Nery e Santos (1993), avaliando o efeito do estresse osmótico sobre os níveis de carboidratos na hemolinfa, brânquias, músculo e hepatopâncreas de *C. granulatus*, verificaram no verão um aumento dos níveis de carboidratos em quase todos tecidos em animais submetidos aos choques hipo e hiperosmótico. Contudo, no inverno, a mobilização de carboidratos ocorreu somente nas brânquias e hepatopâncreas.

Luvizzotto-Santos et al. (2003) verificaram diferenças sazonais na concentração de lipídios totais em brânquias, músculo e hepatopâncreas de *C. granulatus*. Esses tecidos apresentaram concentrações maiores de lipídios em animais de inverno quando comparados aos caranguejos de verão. Esses autores verificaram que a concentração de lipídios totais nas brânquias e no músculo foi significativamente menor em caranguejos submetidos a sete dias de estresse hiposmótico do que naqueles submetidos ao mesmo período de estresse hiperosmótico ou mantidos em condições controle. As reservas lipídicas do hepatopâncreas não foram mobilizadas durante o estresse osmótico.

Os estudos sobre o metabolismo de carboidratos em crustáceos decápodes têm demonstrado a presença das vias da glicogênese, da glicogenólise, da glicólise, da gliconeogênese e da neoglicogeniogênese em diferentes tecidos (Chang e O'Connor, 1983; Loret et al., 1989; Loret e Devos, 1992; Vinagre e Da Silva, 1992; Schmitt e Santos, 1993; Oliveira e Da Silva, 1997, Marqueze, 2004).

A gliconeogênese (Fig. 1) é a via responsável pela síntese *de novo* de glicose a partir de precursores como lactato, glicerol, aminoácidos, piruvato e propionato (Moon, 1988; Marks et al., 1996; Corssmitt et al., 2001) (Fig.2). Nessa via, seis moléculas de ATP são requeridas para a formação de uma molécula de glicose. O ATP necessário para a via gliconeogênica é fornecido pela oxidação de ácidos graxos. Geralmente, nas condições metabólicas nas quais a síntese de glicose pelo fígado é necessária, há um aumento da disponibilidade de ácidos graxos na circulação. Esses ácidos graxos são oxidados a corpos cetônicos nas mitocôndrias, com simultânea produção de ATP. O ATP é utilizado como fonte de energia pela via gliconeogênica (Devlin, 1997). Cabe ressaltar que hormônios como insulina, glucagon, catecolaminas e glicocorticóides, que atuam na modificação dos níveis de glicose circulantes, apresentam um efeito modulador distinto sobre a capacidade gliconeogênica em diferentes espécies de vertebrados (Kraus-Friedmann, 1984; Moon, 1988; Corssmitt et al., 2001).

Segundo Moon (1988), a gliconeogênese seria uma via filogeneticamente antiga, visto que suas enzimas são encontradas desde fungos até mamíferos como o homem. Em vertebrados essa via é muito estudada; em mamíferos ocorre no fígado, nos rins e no intestino delgado (Marks et al., 1996; Corssmitt et al., 2001; Mithieux et al., 2004; Habold et al., 2005). Contudo, em invertebrados, pouco se sabe sobre a síntese *de novo* da glicose. A precisa contribuição dessa via na manutenção da glicemia difere conforme a espécie e a sua capacidade de adaptação bioquímica às mudanças dos níveis glicêmicos.

As atividades das quatro enzimas-chave da gliconeogênese (Fig. 1), piruvato carboxilase (PC, EC 6.4.1.1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, EC 4.1.1.32), frutose-1-6-bifosfatase (FBFase, EC 3.1.3.11) e glicose-6-fosfatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) têm sido verificadas em uma variedade de espécies de vertebrados e

invertebrados. A distribuição dessas enzimas-chave, principalmente a PEPCK, entre diferentes frações celulares, varia conforme as espécies (Kraus-Friedmann, 1984; Moon, 1988; Corssmitt et al., 2001). A PC catalisa a conversão do piruvato em oxalacetato na mitocôndria. Este é um precursor tanto para a gliconeogênese como para o ciclo de Krebs. A PEPCK catalisa a conversão do oxalacetato em fosfoenol piruvato na mitocôndria e/ou no citosol, conforme a espécie estudada. Em humanos, a PEPCK se localiza tanto no citosol como na mitocôndria (Marks et al., 1996; Corssmitt et al., 2001). Em ratos e camundongos, a PEPCK hepática é principalmente citoplasmática; em outros mamíferos, como nos coelhos e nos porcos da índia (Wiese et al., 1991), está presente nos dois compartimentos do hepatócito. Em aves, a PEPCK hepática é mitocondrial (Moon, 1988). Em trutas, a PEPCK foi parcialmente clonada e sequenciada, sendo semelhante à PEPCK mitocondrial de mamíferos (Panserat et al., 2001). No tecido adiposo de ratos, a PEPCK citosólica participa da gliceroneogênese, produção de glicerol-3-fosfato a partir de outros substratos que não hexoses e glicerol (Hanson e Reshef, 2003). Recentemente, foi verificada uma correlação positiva entre o aumento da atividade da PEPCK renal e hepática e a gliconeogênese *in vivo* em codornas submetidas ao jejum prolongado (Sartori et al., 2000).

As demais etapas da gliconeogênese ocorrem no citosol. A FBFase catalisa a conversão da frutose 1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato. A glicose-6-fosfatase localiza-se na membrana do retículo endoplasmático e transforma glicose-6-fosfato em glicose, participando da última etapa da gliconeogênese e da glicogenólise. Essas duas reações liberam fosfato (Marks et al., 1996; Nordlie et al., 1999).

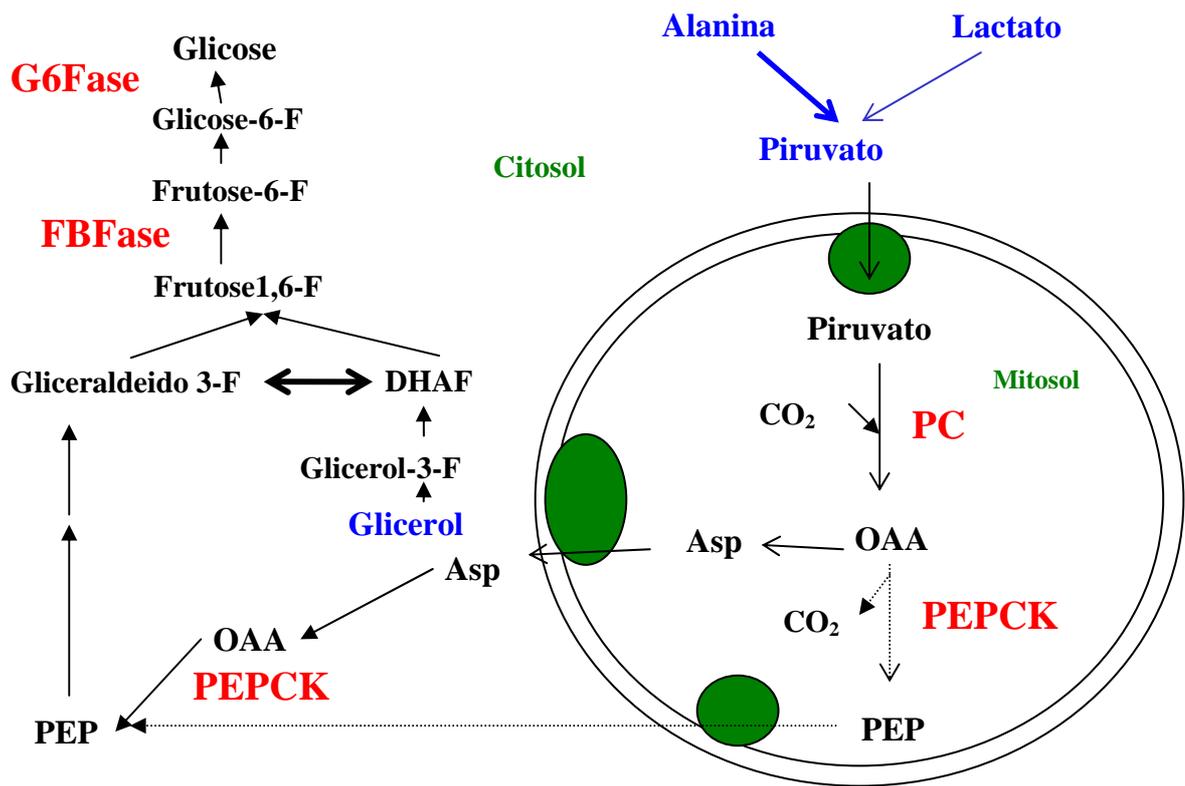


Fig. 1: Esquema da gliconeogênese, mostrando alguns dos principais substratos e as enzimas-chave dessa via. PC = piruvato carboxilase, PEPCK = fosfoenolpiruvato carboxiquinase, FBFase = frutose-1-6-bifosfatase, G6Fase = glicose-6-fosfatase, OAA = oxalacetato, PEP = fosfoenolpiruvato, Asp = aspartato, DHAF = diidroxiacetona fosfato. Adaptado de Marks et al., 1996.

Em invertebrados, a via gliconeogênica e a atividade das enzimas-chave dessa via foram evidenciadas em uma variedade de espécies. Mustafa et al. (1983) demonstraram a conversão de vários precursores gliconeogênicos, quando fornecidos exogenamente sob condições aeróbias, em glicogênio nos tecidos de *Tubifex sp*, um Oligochaeta anaeróbico facultativo. A capacidade gliconeogênica a partir de alanina, ácido aspártico ou ácido glutâmico uniformemente marcados foi demonstrada, *in vitro*, no coleoptera *Tenebrio molitor* (Gourdoux et al., 1983). Os autores verificaram que a alanina foi o precursor preferencial utilizado para a conversão em trealose nesse besouro. A presença de enzimas da via gliconeogênica foi verificada em corpos gordurosos de baratas (Storey e Baleiy, 1978) e no parasita *Schistosoma mansoni*

(Tielens et al., 1991). Zammit e Newsholme (1978) verificaram a atividade da PEPCK em músculo do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus* e da lagosta *Homarus vulgaris* e sugeriram que essa enzima catalisa a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, sendo parte da via de oxidação de alguns aminoácidos nos músculos desses animais. Em brânquias do mexilhão *Modiolus demissus*, a PEPCK apresenta o peso molecular de 70 KDa e é predominantemente citosólica (Harlocker et al., 1991). No hepatopâncreas e no manto do molusco *Megalobulimus oblongus* a atividade da enzima PEPCK é predominante mitocondrial, entretanto, no coração e no diafragma a maior atividade foi constatada na fração citosólica (Dias 1996; 2000).

Em crustáceos, a capacidade gliconeogênica já foi constatada no hepatopâncreas (Munday e Poat, 1971; Oliveira e Da Silva, 1997), nas brânquias (Thabrew et al., 1971), nos hemócitos (Johnston e Davies, 1972) e no músculo (Schein et al., 2004). A atividade da PEPCK e da FBFase foi demonstrada em tecidos do siri *Callinectes sapidus* (Lallier e Walsh, 1991), de caranguejos *Chaceon fenneri* e *Chaceon quinquendes* (Walsh e Henry, 1990) e em crustáceos hipógenos e epígenos (Hervant, 1996).

Oliveira e Da Silva (1997) demonstraram, pela primeira vez, a presença da via gliconeogênica e a atividade da PEPCK no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulatus*. Nesse trabalho, a comparação da capacidade de síntese de glicose a partir de [<sup>14</sup>C] - alanina com aquela a partir de [<sup>14</sup>C]-lactato, demonstrou que o substrato preferencial para a síntese de glicose pelo hepatopâncreas é a alanina, e em animais alimentados, a capacidade intrínseca deste tecido em sintetizar glicose é alta e independe da composição da dieta administrada aos caranguejos. Os autores sugerem que a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica permite ao *C. granulatus* adaptar-se às variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, a

temperatura, o ciclo de marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose, principal substrato energético em crustáceos.

Estudando o efeito de diferentes tempos de jejum sobre a capacidade gliconeogênica, a concentração de glicogênio hepatopancreático e a concentração de glicose na hemolinfa de *C. granulatus* alimentados previamente com dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos, Oliveira et al. (2004b) constataram, nos animais alimentados com a dieta rica em proteínas, que a concentração de glicose na hemolinfa foi mantida principalmente pela gliconeogênese, enquanto nos animais mantidos previamente com a dieta rica em carboidratos, o glicogênio foi o principal substrato energético utilizado durante o jejum, embora após quinze dias de privação de alimento tenha aumentado a produção de glicose a partir de alanina.

A hidrólise de triglicerídios resulta em ácidos graxos e glicerol, sendo este último um importante substrato para a gliconeogênese. A fosforilação do glicerol pela enzima glicerol quinase produz glicerol-3-fosfato, o qual pode ser convertido pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase em diidroxiacetona fosfato, um intermediário da via gliconeogênica (Fig. 2). O último estágio da glicólise pode competir com a gliconeogênese e converter a diidroxiacetona fosfato em lactato (ou em piruvato para completar a oxidação até  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ ) (Marks et al., 1996). Estudos sobre a produção e a utilização de glicerol em humanos demonstram que a lipólise ocorre principalmente no tecido adiposo, embora possa ocorrer em outros tecidos como o músculo. O glicerol liberado na circulação sistêmica é utilizado principalmente pelo fígado onde é convertido, principalmente, em glicose pela via gliconeogênica (Newsholme e Leech, 1983).

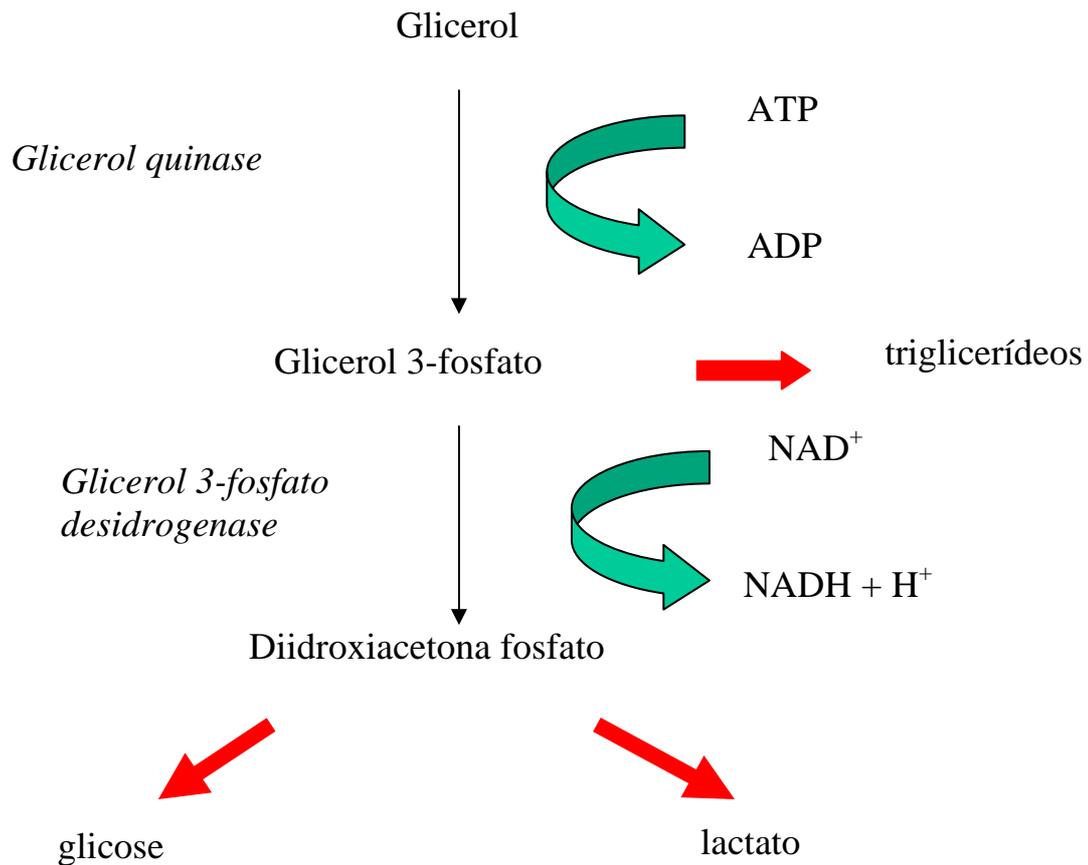


Fig. 3: Via gliconeogênica, a partir de glicerol. Adaptado de Marks cols., 1996.

Estudos com glicerol como fonte de carbono para gliconeogênese são escassos. Em condição de jejum, o glicerol pode ser um importante precursor gliconeogênico em mamíferos. A utilização de substratos alternativos para a via gliconeogênica não têm sido muito investigada em vertebrados, embora se saiba que o glicerol e a serina são bons precursores em algumas espécies de peixes (Moon, 1988). Niwa et al. (1986) verificaram um aumento transitório na produção de glicose e de lactato em fígado de galinha perfundido com 5 mM de glicerol. Lietz et al. (1999) verificaram que a adição de 2mM de glicerol ao meio de incubação é necessária para induzir a gliconeogênese a partir de 1mM de alanina em túbulos corticais renais de coelho.

Em invertebrados, no inseto *Manduca sexta* alimentados com dieta com baixa concentração de carboidratos, Thompson (1997) verificou um aumento na síntese de

trealose a partir de [1,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] - glicerol. Esses insetos mantiveram sua glicemia semelhante àquela de animais alimentados com dieta natural.

A literatura descreve poucos estudos envolvendo alterações ambientais e a atividade da via gliconeogênica. Muitas vezes os efeitos encontrados podem estar mascarados por alterações sazonais do metabolismo e das reservas metabólicas (Moon, 1988). Newsome et al. (1994) demonstraram que os níveis de RNAm de PEPCK aumentam quando fígados isolados de ratos eram perfundidos com meio hiperosmótico, e diminuíram quando perfundidos com meio hiposmótico. Goswani et al. (2004) demonstraram que as atividades das enzimas G6Fase, FBFase e PEPCK aumentaram após a perfusão de fígado de peixes *C. batrachus* com meio hiperosmótico. Entretanto o estresse hiposmótico diminuiu a atividade dessas enzimas.

Em caranguejos *C. granulatus* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas e submetidos ao estresse por anoxia ambiental durante 8 horas, as concentrações de lactato e glicose na hemolinfa aumentaram 10-14 vezes quando comparadas aquelas do grupo normoxia. No período de recuperação, os caranguejos alimentados com uma dieta rica em proteínas reduziram em cerca de 93% a concentração de L-lactato hemolinfático. Essa diminuição foi acompanhada pelo aumento da conversão de [<sup>14</sup>C]-L-lactato em [<sup>14</sup>C] glicose, e pela elevação da atividade das enzimas lactato desidrogenase e PEPCK hepatopancreáticas. Entretanto, nos caranguejos mantidos com a dieta rica em carboidratos, o valor de lactato hemolinfático diminuiu lentamente durante a recuperação (Oliveira et al., 2004a).

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática durante o processo de adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo *C. granulatus*. Animais alimentados com dieta rica em proteínas e submetidos ao estresse hiposmótico durante um período de 6 dias aumentaram a

capacidade gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-alanina- aos 3 dias de estresse. Nos animais submetidos a uma dieta rica em carboidratos o aumento somente foi verificado aos 6 dias de estresse. Porém, quando o substrato utilizado era o ácido láctico-C<sup>14</sup>, ambos os grupos apresentaram uma redução da capacidade gliconeogênica a partir de 3 dias de estresse hiposmótico. Em ambas as dietas, o aumento da capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas, durante o estresse hiposmótico, foi acompanhado pela elevação da atividade da enzima PEPCK mitocondrial. Rosas et al. (2001) demonstraram que a atividade da PEPCK hepatopancreática aumenta em resposta a baixa salinidade no camarão *Litopenaeus vannamei*.

Recentemente, a PEPCK muscular do caranguejo *C. granulatus* foi clonada (GenBank AY074922) e seqüenciada e sua atividade foi constatada predominantemente na fração mitocondrial (Schein et al., 2004). A seqüência nucleotídica do DNAC da PEPCK do *C. granulatus* tem 80% de semelhança com a seqüência da PEPCK de outros Malacostraca e apresentou resíduos específicos de PEPCK mitocondrial, também foi verificada a expressão da enzima no hepatopâncreas, no sistema nervoso, no coração e nas brânquias de *C. granulatus*. Em vertebrados, tem sido demonstrado que a expressão do gene da PEPCK mitocondrial é constitutiva (Hanson e Reshef, 1997). Entretanto, foi constatado um aumento na atividade e nos níveis de RNAm da PEPCK mitocondrial de *C. granulatus* após 1 dia de estresse hiperosmótico, acompanhado do aumento da capacidade gliconeogênese a partir de alanina (Schein et al., 2004). Chittó (2000) verificou que a atividade da enzima PEPCK, nas brânquias posteriores e anteriores do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* no inverno, foi predominante na fração mitocondrial. No verão, não houve variação entre as frações mitocondrial e citosólica nos animais controle, entretanto, somente a atividade da PEPCK citosólica diminuiu após 1 dia de estresse hiperosmótico e após 3 dias de estresse hiposmótico em brânquais

anteriores e posteriores, respectivamente, quando comparada ao grupo controle (dados não publicados).

Schein et al. (2005a) verificaram que a gliconeogênese muscular em *C. granulatus* está envolvida no ajuste metabólico durante a adaptação ao estresse osmótico. Entretanto, a resposta da via gliconeogênica ao estresse osmótico é sazonal modificando-se conforme a estação do ano: inverno ou verão.

Em brânquias isoladas de *Carcinus maenas*, Thabrew et al. (1971) verificaram um aumento da síntese de glicogênio e da produção de glicose quando esse tecido era incubado em meio hiposmótico. Também verificaram a presença das enzimas frutose 1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase, enzimas-chave da gliconeogênese nas brânquias desse caranguejo.

Chittó (2000) verificou o efeito de 1, 3 e 6 dias de estresse hiposmótico (0‰) ou hiperosmótico (34‰) sobre a capacidade gliconeogênica através da conversão de [<sup>14</sup>C]-U - L -alanina- em [<sup>14</sup>C]-glicose em brânquias anteriores e posteriores no verão. A autora verificou uma diminuição da gliconeogênese no 1º dia de estresse hiperosmótico nas brânquias anteriores e no 3º dia de choque hiposmótico nas brânquias posteriores desse crustáceo. A diminuição da capacidade gliconeogênica nas brânquias posteriores constatada no 3º dia de estresse hiposmótico por Chittó (2000) seria uma consequência da diminuição das concentrações intracelulares de aminoácidos livres induzida pelo choque osmótico, levando o tecido a utilizar glicose livre como substrato energético. Uma redução nos níveis de glicose livre foi verificada nesse tecido por Chittó (2000) e Vinagre (1999) durante o estresse hiposmótico de 6 dias.

O caranguejo *C. granulatus*, dada a excelente adaptação às condições de laboratório e a capacidade de se adaptar a variações de salinidade e de teor de O<sub>2</sub> no seu

habitat, é considerado um modelo biológico muito adequado para a investigação sobre o controle do metabolismo intermediário em crustáceos (Kucharski, 1990).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Verificar o efeito do estresse hiposmótico e hiperosmótico sobre a via gliconeogênica a partir de glicerol em brânquias e sobre a concentração de lipídios totais em diferentes tecidos de *Chasmagnathus granulatus*, no inverno e no verão, bem como a atividade das enzimas gliconeogênicas glicose-6-fosfatase e frutose 1,6-bifosfatase.

### **Objetivos específicos**

- a) Determinar, as concentrações de lipídios totais, em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas, músculo da quela e hemolinfa de animais do grupo controle ou submetidos a 1, 3 e 6 dias de estresse hipo ou hiperosmótico no inverno e no verão.
- b) Determinar a formação de glicose a partir de [<sup>14</sup>C] - glicerol-, *in vitro*, em brânquias anteriores e posteriores de animais do grupo controle ou submetidos a 1, 3 e 6 dias de estresse hipo ou hiperosmótico no inverno e no verão.
- c) Determinar a atividade das enzimas frutose 1,6-bifosfatase e glicose-6-fosfatase em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo da mandíbula de animais do grupo controle ou submetidos a 3 dias de estresse hipo ou hiperosmótico no verão.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais

O caranguejo *Chasmagnathus granulatus*, conhecido como “catanhão” ou “gatanhão” entre os pescadores e habitantes do litoral do Brasil Meridional, situa-se sistematicamente na Superclasse Crustacea, Classe Malacostraca, Ordem Decapoda, Família Varunidae (Cuesta et al, 2001). A espécie vive em estuários de sedimento areno-lodoso, desde o Rio de Janeiro, no Brasil, até o Golfo de São Martin, na Argentina. Populações numerosas são encontradas na região estuarina de Tramandaí e no estuário da Lagoa dos Patos, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Bond-Buckup et al., 1991).

Este crustáceo evoluiu de formas marinhas, tornando-se uma espécie tipicamente estuarina. No seu habitat, cavam suas tocas geralmente no horizonte superior e supralitoral, deslocando-se para o mesolitoral inferior e infralitoral em busca de umidade e alimento. De forma geral, os animais maiores, principalmente os machos, encontram-se em locais abertos, enquanto as fêmeas e os animais jovens dão preferência aos locais com vegetação (Bond-Buckup et al., 1991).

O *C. granulatus* possui oito pares de brânquias, dispostas nos primeiros 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; Luquet et al., 2000 ).

## 1.1. Coleta e manutenção dos animais

Para minimizar possíveis efeitos fisiológicos do ciclo reprodutivo e dos períodos de muda, foram utilizados caranguejos *Chasmagnathus granulatus* machos, adultos no período de intermuda (Drach e Tchernigovtzeff, 1967), pesando 15 a 17 g. Os animais foram coletados na margem leste da Lagoa de Tramandaí, Rio Grande do Sul (coordenadas 29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste), em marisma tipicamente estuarino, parcialmente coberto pela vegetação halo-hidrófila e cortado por arroios que drenam a água de origem pluvial da planície costeira. O clima da região é considerado subtropical úmido, com temperatura média de 19°C na primavera, 22 °C no outono, 26 °C no verão e 15 °C no inverno [dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE)]. Em seu habitat, Turcato (1990) verificou que o teor de O<sub>2</sub> dissolvido na água varia entre 2,78 a 11,78 mgO<sub>2</sub>/L e a salinidade oscila de 0,22 a 34‰.

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.

No laboratório, os animais foram submetidos a um choque hiposmótico com água destilada durante 24 horas, com a finalidade de limpar o conteúdo estomacal e eliminar parasitas (Kucharski, 1997). A seguir, os animais foram colocados em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante. Durante duas semanas os caranguejos foram alimentados, *ad libitum*, diariamente com carne bovina ao final da tarde (período de maior atividade desses animais no seu habitat natural).

## **2. Procedimentos experimentais**

Após as duas semanas de aclimação, os caranguejos foram divididos em dois grupos experimentais e submetidos durante 1, 3 e 6 dias ao estresse hipo ou hiperosmótico.

Os animais submetidos ao estresse hiperosmótico foram colocados em um aquário com salinidade de 34‰, a mais alta encontrada por Turcato (1990) no local de coleta destes caranguejos.

Os animais submetidos ao estresse hiposmótico foram colocados em aquário com água destilada (salinidade de 0‰). As salinidades foram determinadas através de um refratômetro (ATAGO S/MILL).

Durante os períodos de estresse, os animais foram mantidos em aquários com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, aeração e alimentação do período de aclimação, recebendo alimento até 16 horas antes de serem sacrificados.

## **3. Determinações bioquímicas**

Ao final dos períodos experimentais de 1, 3 e 6 dias de estresse hiper ou hiposmótico, amostras da hemolinfa foram coletadas das articulações do 4º e 5º pereiópodos utilizando-se seringas de 1 mL e anticoagulante oxalato de potássio a 10% para a determinação dos lipídios totais. Após os animais foram crioadestesiados e amostras de brânquias anteriores e posteriores, do hepatopâncreas e do músculo da quela foram utilizadas para determinação de lipídios totais.

Amostras das brânquias anteriores separadas das posteriores foram utilizadas para determinação, *in vitro* da síntese de [<sup>14</sup>C]-glicose a partir de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol.

Também, foi verificada a atividade das enzimas frutose 1,6-fosfatase (FBFase) e glicose-6-fosfatase (G6Fase) em animais controle e submetidos a 3 dias de estresse hipo ou hiperosmótico no verão.

Os animais mantidos nos aquários nas condições de aclimação constituíram o grupo controle e estes caranguejos foram sacrificados juntamente com os animais dos demais grupos experimentais.

As brânquias anteriores e posteriores foram separadas, pois na literatura está descrito que as brânquias dos crustáceos decápodes apresentam função e ultraestrutura diferente. Assim como em outros crustáceos decápodes, as brânquias anteriores de *C. granulatus* apresentam função respiratória e as posteriores função osmorregulatória (Chausson e Renault, 1995; Luquet et al., 2000; Genovese et al., 2004).

### **3.1. Determinação dos lipídios totais**

A extração dos lipídios totais foi feita pelo método de Folch et al. (1957) e a concentração determinada pelo método colorimétrico de sulfofosfovanilina (Kit Lipídios totais Doles Reagentes), onde os ácidos graxos liberados por hidrólise pelo ácido sulfúrico reagem em meio ácido com a Vanilina.

### **3.2. Gliconeogênese a partir de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol**

Após os procedimentos experimentais, os animais foram crioadestesiados por 10 minutos e amostras de 50 a 100 mg das brânquias anteriores e posteriores dos animais do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico foram removidas e mantidas em placas de Petry com solução fisiológica de caranguejo

(SFC) gelada adaptada a partir daquela descrita por Lorêt (1989) com osmolaridade semelhante a da hemolinfa.

Na tabela 1 estão representados os valores em mOsm/kg de H<sub>2</sub>O das SFCs utilizadas em três grupos experimentais e naqueles da hemolinfa de caranguejos controles e submetidos durante 3 dias ao estresse hipo ou hiperosmótico. As osmolalidades da hemolinfa e das soluções fisiológicas foram medidas por criocristalização pelo osmômetro automático KNAUER. (Chittó, 2000).

TABELA 1. Osmolalidade das soluções fisiológicas de caranguejo (SFC) utilizadas como meio de incubação para os três grupos experimentais e das hemolinfas dos animais dos grupos controle e 3 dias de estresse hipo ou hiperosmótico.

SFCs	Osmolalidade (mOsm/kg de H <sub>2</sub> O)
SFC com NaCl 300mM	691
SFC com NaCl 400mM	815
<b>Grupos experimentais</b>	
Controle	777 ± 51,04*
Estresse hiposmótico	736 ± 16,02*
Estresse hiperosmótico	881 ± 10,81*

\* Média ± desvio padrão de 6 animais.

Composição dos meios de incubação utilizados nos experimentos:

**a) Controle e estresse hiposmótico** (691 mOsm/Kg de H<sub>2</sub>O) 300 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8,8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0,1 mM fenilmetilsufonil fluoride (PMSF), pH 7,8.

**b) Estresse hiperosmótico** (815 mOsm/Kg de H<sub>2</sub>O) 400 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8,8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, 0,1 mM fenilmetilsufonil fluoride (PMSF), pH 7,8.

Foram feitos pequenos cortes nas lamelas das brânquias anteriores e posteriores, e as artérias aferente e eferente foram retiradas para possibilitar maior contato do tecido com o meio de incubação. A seguir as amostras foram colocadas em tubos de 2ml, previamente pesados, contendo 500 $\mu$ l de SFC com as osmolalidades adequadas (Tabela 1) acrescida de 0.2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C]-glicerol (Amersham Pharmacia Biotech, 5.25GBq/mmol, 142mCi/mmol) e mais 5 mM de glicerol não marcado (GibcoBRL). Os tubos foram repesados para a determinação do peso dos tecidos. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff, sob agitação constante a 25°C.

Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas mediante a imersão dos tubos em banho de gelo. O meio de incubação foi centrifugado a 3000 rpm durante 2 minutos e 300 $\mu$ l do sobrenadante transferido para tubos de 1,5 ml para desproteinização com 75 $\mu$ l de Ba(OH)<sub>2</sub> saturado + 75 $\mu$ l de ZnSO<sub>4</sub> a 2% (Somogyi, 1945). Após uma segunda centrifugação (3000 rpm/10 min.), o sobrenadante foi utilizado para a determinação do [<sup>14</sup>C]-glicose formada pela gliconeogênese.

A determinação da glicose-<sup>14</sup>C foi realizada através de cromatografia em camada fina (placas de alumínio com sílica gel 60 MERCK), conforme método descrito por Baker et al. (1965) e adaptado por Oliveira e Da Silva, 1997. A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallace), calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram expressos em  $\mu$ moles de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol convertidos em [<sup>14</sup>C] glicose.g<sup>-1</sup> de tecido. min.<sup>-1</sup>.

Utilizando-se caranguejos do grupo controle, foi realizada uma curva de tempo de incubação de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, para se avaliar a conversão de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose em presença de 5mM de glicerol não marcado (Fig. 3).

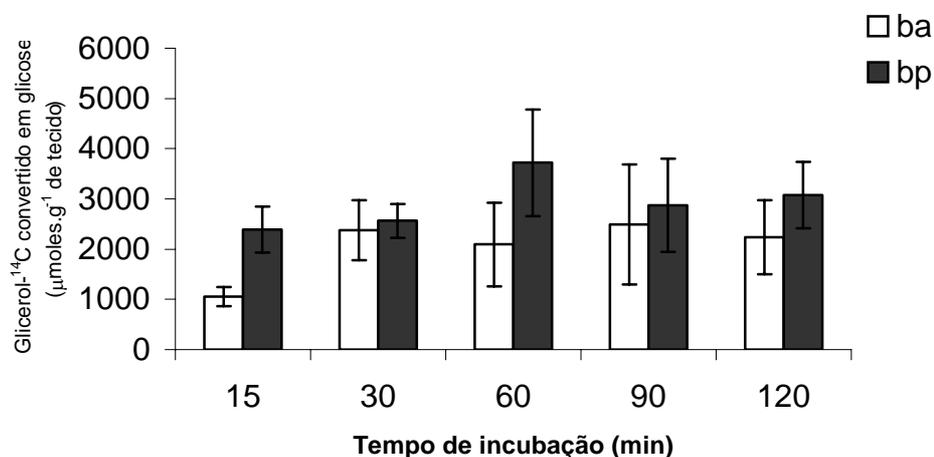


Fig. 3: Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a conversão de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose nas brânquias anteriores e posteriores de animais mantidos em aquários a 20‰. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DP de 3 - 6 animais.

Também, trabalhando com os caranguejos adaptados à salinidade de 20 ‰ foi avaliada a capacidade gliconeogênica, nas brânquias anteriores e posteriores, em presença de concentrações crescentes de glicerol (Fig.4). Foram adicionadas ao meio de incubação as concentrações de 2,5; 5; 10 e 20mM, valores utilizados anteriormente para incubação com L-alanina (Oliveira e Da Silva, 1997; Chittó, 2000).

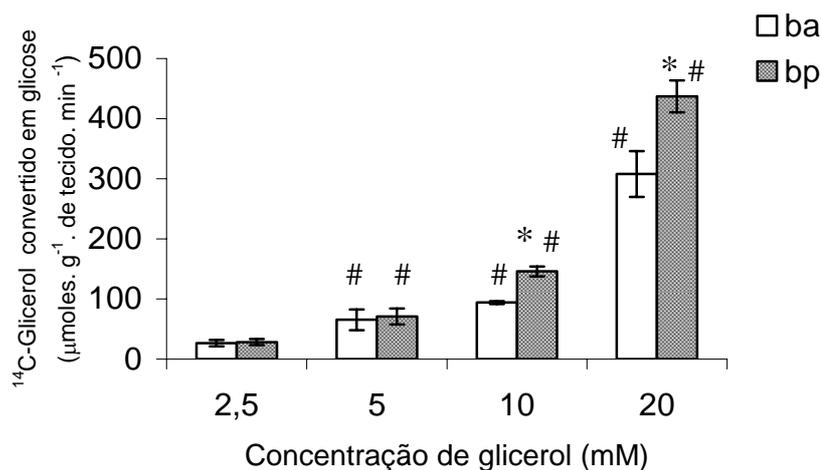


Fig. 4: Efeito de diferentes concentrações de glicerol no meio de incubação sobre a conversão de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol em  $[\text{C-}^{14}]$ -glicose, nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos mantidos em aquários a 20‰. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  DP de 3-4 animais.

Foi escolhido o tempo de incubação de 30 minutos e a concentração de 5 mM de glicerol não marcado para incubação dos tecidos nos experimentos com estresse osmótico.

### 3.3. Atividade das enzimas FBFase e G6Fase

Para determinar a atividade das enzimas FBFase e G6Fase, amostras das brânquias anteriores e posteriores, do hepatopâncreas e do músculo foram homogeneizadas em 3 volumes de sacarose 0,25M gelada. O homogenado foi centrifugado por 10 min. a 600xg e o sobrenadante resultante foi centrifugado por 15 min. a 12.000xg. Amostras do novo sobrenadante foram usadas para o ensaio enzimático segundo Battastini et al. (1991).

Para a determinação da atividade das enzimas, amostras foram incubadas em banho metabólico durante 10 minutos a 25°C nos seguintes sistemas:

- 1) G6Fase: tampão maleato 0,1M, pH 6,8 e glicose-6-fosfato 0,02M (Camargo e Migliorini, 1971);
- 2) FBFase: tampão glicilglicina 0,25M, pH 7-7,4 e frutose 1,6 bifosfato 0,025M (Camargo e Migliorini, 1971).

A reação foi interrompida com TCA 10%. O fosfato produzido na reação foi medido pelo método de Chan e Swaminathan (1986). Os resultados foram expressos em nmol Pi. min.<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína.

### **3.4. Dosagem de proteína**

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina bovina como padrão.

## **4. Tratamento estatístico**

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão da média. Os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Dos dados obtidos, a comparação entre dois grupos foi feita pelo teste T de Student para dados não pareados. Para a comparação entre vários grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) ou de duas vias seguidas pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Os resultados foram analisados através do programa SigmaStat para Windows.

## **TRABALHOS DESENVOLVIDOS**

## CAPÍTULO 1

Varição sazonal da atividade gliconeogênica nas brânquias e da concentração de lipídios totais em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* aclimatados às condições hiperosmóticas

Autores: Chittó, Ana Lúcia Fernandes; Schein, Vanessa; Etges, Rodrigo; Kucharski, Luiz Carlos; Da Silva, Roselis Silveira Martins

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

Periódico: Aquaculture

## RESUMO

Em *Chasmagnathus granulatus* a gliconeogênese provavelmente é uma das vias envolvidas no mecanismo de adaptação deste caranguejo às alterações da osmolaridade do meio. Assim, foi investigada a participação da via gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus* e dos lipídios totais das brânquias, hepatopâncreas, músculo da quela e hemolinfa no ajuste metabólico durante a aclimação ao estresse hiperosmótico de 1, 3 e 6 dias no inverno e no verão. A gliconeogênese em brânquias anteriores e posteriores do grupo controle foi maior no verão do que no inverno. No verão, no grupo controle, a gliconeogênese das brânquias posteriores foi maior do que aquela das brânquias anteriores. A participação da via gliconeogênica no ajuste metabólico ao estresse hiperosmótico foi evidenciada em brânquias posteriores pela diminuição da conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose no 3º dia de estresse no verão e, em ambas as brânquias, no 1º dia de estresse no inverno. Estes dados demonstram a capacidade da síntese de [<sup>14</sup>C]-glicose a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus*. No inverno, houve um aumento da concentração de lipídios totais no 1º dia de estresse no hepatopâncreas acompanhado por uma redução de lipídios totais na hemolinfa. No verão, a concentração de lipídios totais diminuiu no 6º dia de estresse osmótico nas brânquias posteriores, no 3º dia no hepatopâncreas e durante todo o período experimental, no músculo, sugerindo a utilização desse substrato como fonte energética durante a aclimação ao estresse.

Palavras chave: *Chasmagnathus*, estresse hiperosmótico, glicerol, gliconeogênese, lipídios totais

## INTRODUÇÃO

As variações de salinidade levam os organismos estuarinos e marinhos intertidais a mudanças na composição orgânica e inorgânica dos fluidos corporais, exigindo desses animais ajustes homeostáticos compensatórios (Kasschau et al., 1984; Matsushima e Hayashi, 1992; Bishop e Burton, 1993; Okuma e Abe, 1994; Pillet et al., 1995).

Segundo Gilles (1982), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: (1) regulação anisomótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolaridade da hemolinfa independente da osmolaridade do meio externo; (2) regulação isomótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolaridade do fluido e do volume intracelular, com o objetivo de mantê-lo isomótico em relação ao fluido extracelular.

O processo de regulação anisomótica do fluido extracelular resulta de um balanço entre os fenômenos de efluxo e influxo de efetores osmóticos, principalmente íons. Os principais componentes fisiológicos desse balanço, entre os efetores osmóticos e a água, são a permeabilidade da superfície corporal e o transporte ativo, principalmente nas brânquias, trato intestinal e órgãos excretores (Gilles e Delpire, 1997; Gilles, 1997).

O termo regulação isomótica do fluido intracelular define os mecanismos responsáveis pelo ajuste ativo da pressão osmótica intracelular em relação a novas pressões osmóticas dos fluidos corpóreos, impedindo assim grandes alterações na concentração intracelular (Jenieux e Florkin., 1961).

A ocorrência da gliconeogênese e da neoglicogeniogênese em crustáceos, principalmente decápodes, já foi demonstrada no hepatopâncreas (Van Aardt, 1988; Hill

et al., 1991; Lallier e Wash, 1991; Oliveira e Da Silva, 1997; Hervant et al., 1999), nas brânquias (Thabrew et al., 1971; Chittó, 2000) e nos hemócitos (Johnston et al., 1973). Recentemente, a atividade da phosphoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a capacidade de incorporação de [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose foram demonstradas em músculo adutor da mandíbula de *C. granulatus* (Schein et al., 2004). Também foi realizada a clonagem molecular da PEPCK muscular (AY074922) e determinada sua expressão no hepatopâncreas, no sistema nervoso, no coração e nas brânquias de *C. granulatus* (Schein et al., 2004).

Schein et al. (2004; 2005) demonstraram que os níveis de RNAm da PEPCK, a gliconeogênese e a atividade da PEPCK no músculo de *C. granulatus* aumentaram após submeter os animais ao estresse hiper ou hiposmótico de 1 dia. Entretanto, o padrão de resposta do tecido ao estresse osmótico varia conforme a estação do ano: inverno ou verão (Schein et al., 2005).

No hepatopâncreas, Oliveira e Da Silva (2000) constataram no 3º dia de estresse hiposmótico, em *C. granulatus*, um aumento da conversão da [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose que foi acompanhado pela elevação da atividade da PEPCK. Estes autores sugerem que os aminoácidos liberados dos diferentes tecidos durante o estresse hiposmótico seriam desaminados no hepatopâncreas, e as cadeias de carbonos utilizadas como substrato para a via gliconeogênica no hepatopâncreas. No camarão *Litopenaeus vannamei* juvenil foi demonstrado que a aclimação à baixa salinidade aumentava a atividade da PEPCK hepatopancreática (Rosas et al., 2001).

Os principais lipídios de crustáceos são os neutros, entre estes, 90% são triglicerídios (Gilbert e O'Connor, 1970; Allen et al., 2000). Os lipídios de crustáceos são transportados na hemolinfa por lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Garcia et al., 2002). Na falta de um tecido adiposo diferenciado, o hepatopâncreas parece ser o

principal órgão de reserva e fornecedor de lipídios para o período reprodutivo nesta classe de invertebrados (Jeckel et al., 1991; Hasek e Felder, 2005).

Ao investigarem o efeito da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário em *C. granulatus*, Kucharski e Da Silva (1991a) verificaram que a maior concentração de lipídios no músculo ocorre no verão e diminui no outono e inverno, enquanto as reservas de lipídios do hepatopâncreas são elevadas, cerca de 20% do peso do órgão, diminuindo somente no outono.

Recentemente, Luvizzotto-Santos et al. (2003) verificaram diferenças sazonais na concentração de lipídios totais em brânquias, músculo e hepatopâncreas de *C. granulatus*. Esses tecidos apresentaram concentrações maiores de lipídios em animais de inverno quando comparados aos caranguejos de verão. Esses autores verificaram que a concentração de lipídios totais nas brânquias e no músculo foi significativamente menor em caranguejos submetidos a sete dias de estresse hiposmótico do que naqueles submetidos ao mesmo período de estresse hiperosmótico ou mantidos em condições controle. As reservas lipídicas do hepatopâncreas não foram mobilizadas durante o estresse osmótico.

Em *C. granulatus* a gliconeogênese seria uma das vias envolvidas no mecanismo de adaptação deste caranguejo às alterações da osmolaridade do meio, desafio enfrentado continuamente por animais que habitam ambientes estuarinos. Entretanto, a capacidade gliconeogênica em resposta ao estresse hiper ou hiposmótico pode ser modificada pelas diferenças de sazonalidade (Schein et al., 2005). Com este propósito foi medido, *in vitro*, a conversão do [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose em brânquias posteriores e anteriores de *C. granulatus* submetidos ao estresse hiperosmótico por 1, 3 e 6 dias. Em adição, as concentrações de lipídios totais das brânquias (posteriores e anteriores), do músculo, do hepatopâncreas e da hemolinfa foram determinadas nos

mesmos tempos de estresse estudados. Todos os experimentos foram realizados nos meses de inverno e verão.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Caranguejos eurialinos *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea – Decapoda - Varunidae) machos, adultos no período de intermuda (Drach e Tchernigovtzeff, 1967), pesando 15 a 17 g, foram coletados na Lagoa Tramandaí, Rio Grande do Sul (coordenadas 29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste), em marisma tipicamente estuarino. Turcato (1990) verificou que no habitat deste caranguejo o teor de O<sub>2</sub> dissolvido na água varia entre 2,78 a 11,78 mgO<sub>2</sub>/L e a salinidade oscila de 0,22 a 34‰ ao longo do ano.

No laboratório, os animais foram colocados em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante. Durante duas semanas os caranguejos foram alimentados, *ad libitum*, diariamente com carne bovina. O número total de caranguejos utilizados neste trabalho foi aproximadamente 100.

### **Procedimentos experimentais**

Após as duas semanas de aclimação ao laboratório, os caranguejos foram transferidos para um aquário com salinidade de 34 ‰ (n=12) onde permaneceram durante 1, 3 e 6 dias. Durante os períodos de estresse, os animais foram mantidos em

aquários com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, aeração e alimentação do período de aclimatação, recebendo alimento até 16 horas antes de serem sacrificados.

Os animais do grupo controle foram mantidos em aquários nas condições de aclimatação e estes caranguejos foram sacrificados juntamente com os animais dos demais grupos experimentais. A salinidade foi determinada por meio de um refratômetro (ATAGO S/MILL). Os experimentos foram realizados no inverno (junho, julho e agosto) e verão (dezembro, janeiro e fevereiro). Os dados foram coletados durante anos de 2001 a 2003.

### **Gliconeogênese**

Os animais submetidos aos diferentes tempos de estresse hiperosmótico e os animais controle foram crioanestesiados por 10 minutos e amostras de 50 a 100mg de brânquias anteriores e posteriores foram removidas e colocadas em placas de Petry sobre gelo, contendo solução fisiológica de caranguejo (SFC). Foram feitos pequenos cortes nas lamelas das brânquias, e as artérias aferente e eferente foram retiradas para possibilitar maior contato do tecido com o meio de incubação.

A concentração de glicerol não marcado e o tempo de incubação foram determinados a partir de curvas de concentração e de tempo de incubação em animais controle:

1) Curva de tempo: amostras de 50 a 100mg de brânquias anteriores ou posteriores foram incubadas em meio para o grupo controle com 0,2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol (Amersham Pharmacia Biotech, 5.25GBq/mmol, 142mCi/mmol) e 5 mM de glicerol não marcado (GibcoBRL) durante 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

2) Curva de concentração: amostras de 50 a 100mg de brânquias anteriores ou posteriores foram incubadas durante 30 minutos em meio para o grupo controle com 0,2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol (Amersham Pharmacia Biotech, 5.25GBq/mmol, 142mCi/mmol) e concentrações crescentes de glicerol não marcado (2,5; 5; 10 e 20 mM).

Foi escolhido o tempo de 30 minutos de incubação e a concentração de 5 mM para a realização dos demais experimentos.

As amostras foram colocadas em tubos com 500 $\mu\text{l}$  de SFC contendo:

1) Grupo controle: 300 mM de NaCl, 10 mM KCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 8,8 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mM HEPES e 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), pH 7,8 e 691 mOsm/ Kg de  $\text{H}_2\text{O}$  (a osmolalidade da hemolinfa em 20‰ é de  $777 \pm 51,04$  mOsm/kg de  $\text{H}_2\text{O}$ );

2) Grupo estresse hiperosmótico: 400 mM de NaCl, 10 mM KCl, 25 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 8,8 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 mM HEPES e 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), pH 7,8 815 mOsm/Kg de  $\text{H}_2\text{O}$  (a osmolalidade da hemolinfa em 34‰ é de  $881 \pm 10,81$  mOsm/kg de  $\text{H}_2\text{O}$ ).

Ao meio de incubação dos dois grupos experimentais (controle e estresse osmótico) foi adicionado 0,2  $\mu\text{Ci}$  de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol (Amersham Pharmacia Biotech, 5.25GBq/mmol, 142mCi/mmol) e 5 mM de glicerol não marcado. A seguir, foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ , na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff por 30 minutos sob agitação constante a 25°C.

Decorrido o tempo de incubação, a conversão do  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicerol em  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ -glicose pelas brânquias foi determinada segundo método descrito por Oliveira e Da Silva (1997), utilizando-se cromatografia em camada fina (placas de alumínio com sílica gel

60 MERCK). A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallace). Os valores foram expressos em  $\mu\text{moles de } [^{14}\text{C}]\text{-glicerol convertido em } [^{14}\text{C}]\text{-glicose. g}^{-1}\text{ de tecido. min}^{-1}$ .

### **Determinações bioquímicas**

Ao final dos períodos experimentais de 1, 3 e 6 dias de estresse hiperosmótico, amostras de hemolinfa, de brânquias anteriores e posteriores, de hepatopâncreas e de músculo da quela foram utilizadas para determinação de lipídeos totais.

Para a extração de lipídios totais as amostras foram homogeneizadas em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (Folch et al., 1957). Os ácidos graxos são liberados por hidrólise e reagem com vanilina em presença de ácido sulfúrico (Kit Lipídios totais Doles Reagentes) e a reação foi medida em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) em 530 nm.

### **Tratamento estatístico**

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão da média (média  $\pm$  DPM). Os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Dos dados obtidos, a comparação entre dois grupos foi feita pelo teste T de Student. Para a comparação entre vários grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) ou duas vias seguidas pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o programa SigmaStat para Windows.

## RESULTADOS

Na figura 1 está representado o efeito de diferentes tempos de incubação sobre a conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos controles (20‰). Não houve variação significativa da incorporação de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose entre os tempos estudados em ambas as brânquias. Contudo, em brânquias anteriores houve um aumento de 100 % ( $P > 0,05$ ) aos 30 minutos, enquanto em brânquias posteriores foi verificado um aumento de 50 % ( $P > 0,05$ ) aos 60 minutos, comparado aos 15 minutos de incubação. A capacidade gliconeogênica em brânquias posteriores foi significativamente maior do que em brânquias anteriores aos 15 e 60 minutos de incubação.

A figura 2 mostra o efeito de diferentes concentrações de glicerol no meio de incubação sobre a conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose em brânquias anteriores e posteriores de animais mantidos em aquários com salinidade de 20‰. A incorporação de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose foi significativamente maior em brânquias posteriores do que nas anteriores, quando os tecidos foram incubados com 10 e 20 mM de glicerol não marcado. Houve um aumento da síntese de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose a medida que aumentava a concentração de glicerol no meio de incubação tanto em brânquias anteriores como nas posteriores. Com 20 mM de glicerol no meio de incubação a síntese de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose foi 6 e 8 vezes maior ( $P < 0,05$ ) em brânquias anteriores e posteriores, respectivamente, quando comparada aquela com 2,5 mM de glicerol.

A capacidade gliconeogênica em brânquias anteriores e posteriores do grupo controle foi maior no verão ( $P < 0,05$ ) quando comparada ao inverno (Fig.3A e B).

A Fig. 3A mostra que no verão, não houve variações significativas da conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose em brânquias anteriores ao longo do estresse

hiperosmótico. No inverno, a conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose diminuiu 54% (P< 0,05) no primeiro dia de estresse em brânquias anteriores (Fig 3A).

Em brânquias posteriores, no inverno, a conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose diminuiu 52% (P< 0,05) no primeiro dia de estresse, enquanto no verão uma redução de 34% (P< 0,05) ocorreu aos 3 dias de estresse (Fig. 3B). Contudo, tanto no inverno como no verão, a capacidade gliconeogênica das brânquias posteriores retornou aos valores próximos do controle no final do período experimental (Fig. 3B).

No verão, no grupo controle, a capacidade gliconeogênica das brânquias posteriores foi maior (P< 0,05) do que aquela das brânquias anteriores. Entretanto, no inverno, ambas as brânquias apresentaram a capacidade semelhante de conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose.

A comparação entre inverno e verão, da concentração de lipídios totais nas brânquias anteriores e posteriores do grupo controle, não mostrou variação significativa. Tanto no inverno como no verão, o estresse hiperosmótico não causou alterações significativas na concentração de lipídios totais em brânquias anteriores (Fig. 4 A). Em brânquias posteriores o estresse hiperosmótico, no verão, reduziu em cerca de 34% (P< 0,05) a concentração de lipídios totais somente no 6º dia de estresse osmótico (Fig. 4 B). Entretanto, quando os animais foram submetidos ao estresse hiperosmótico, no inverno, não foram observadas variações significativas da concentração de lipídios totais em brânquias posteriores (Fig. 4 B).

A comparação entre inverno e verão dos valores de lipídios totais no hepatopâncreas do grupo controle não mostrou variação significativa (Fig.5A). Entretanto, ao longo do período de estresse a concentração de lipídios foi significativamente (P< 0,05) menor no verão do que no inverno (54%, 40% e 35% após 1, 3 e 6 dias respectivamente). No inverno, houve um aumento significativo de 124%

( $P < 0,05$ ) no 1º dia de estresse hiperosmótico, enquanto, no verão, houve uma diminuição de 49% ( $P < 0,05$ ) no 3º dia de estresse osmótico.

O estresse hiperosmótico, no inverno, não afetou a concentração de lipídios totais no músculo (Fig. 5B). Porém, no verão, houve uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) dos níveis de lipídios totais ao longo de todo o estresse nesse tecido (32, 38 e 32% após 1, 3 e 6 dias respectivamente) (Fig. 5B).

A Fig 6 mostra que no inverno, houve uma diminuição de 44% ( $P < 0,05$ ) da concentração de lipídios totais na hemolinfa no 1º dia de estresse hiperosmótico, enquanto no verão não houve variações significativas da concentração de lipídios totais hemolinfáticos.

## **DISCUSSÃO**

No grupo controle, não foi verificada diferença sazonal da concentração de lipídios totais nos tecidos estudados. Contudo, Kucharski e Da Silva (1991a) constataram uma diminuição significativa dos valores de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo nos animais de outono e inverno quando comparados aqueles coletados no verão e na primavera. A aclimação durante 15 dias às condições de laboratório com alimentação diária com carne bovina deve ter contribuído para esta diversidade nos resultados, salientando que Kucharski e Da Silva (1991a) avaliaram os níveis de lipídios totais nos caranguejos imediatamente após a captura do habitat. O efeito da composição da dieta sobre o metabolismo intermediário em *C. granulatus* demonstrou que a alimentação por 15 dias com uma dieta rica em proteínas aumentou os níveis de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo e os de lipídios totais no

hepatopâncreas quando comparados aos animais de campo (Kucharski e Da Silva, 1991b).

O presente estudo mostrou que as brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus* têm a capacidade de sintetizar [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol. Estudos anteriores em *C. granulatus* mostraram a capacidade desses tecidos de formar [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose a partir de [ $^{14}\text{C}$ ]-L-alanina e a participação dessa via na adaptação ao estresse osmótico (Chittó, 2000). Como a síntese de glicose a partir de glicerol contém menos etapas que a síntese a partir de alanina, os valores de glicose formada após meia hora de incubação com glicerol foram semelhantes ou até maiores do que aqueles obtidos após uma hora de incubação com alanina, utilizando-se as mesmas condições experimentais (Chittó, 2000).

Neste estudo, a temperatura, salinidade, pressão parcial de oxigênio, disponibilidade e composição do alimento foram controladas, somente a fotoperiodicidade foi a natural de cada estação do ano. No inverno a conversão do [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose nos animais controle foi marcadamente reduzida tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores em relação ao verão. Estes dados são concordantes com estudo prévio em *C. granulatus* que demonstrou que a atividade e a expressão da enzima PEPCCK e a capacidade gliconeogênica do músculo mandibular diminuem significativamente no inverno (Schein et al., 2005). Também foi verificada que a atividade gliconeogênica no tecido branquial e a concentração de lipídios totais nos diferentes tecidos de *C. granulatus* submetidos ao estresse hiperosmótico no inverno diferem daquelas obtidas nos animais que sofreram o estresse osmótico no verão.

Durante o estresse hiperosmótico, os níveis de aminoácidos livres intracelulares nos tecidos de crustáceos eurialinos aumentam quando comparados com animais

submetidos ao estresse hiposmótico, assim contribuindo com a regulação do volume celular (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997). Neste estudo, a diminuição da conversão do [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose, constatada no inverno em ambas as brânquias, refletiria uma redução total da capacidade gliconeogênica com o objetivo de aumentar a concentração de aminoácidos intracelulares durante a primeira fase do processo de aclimação ao estresse hiperosmótico. Ressaltando que no inverno, tanto em animais sob estresse osmótico como nos controles, a capacidade gliconeogênica das brânquias anteriores e posteriores foi marcadamente menor que no verão. Resultado semelhante foi constatado por Schein et al. (2005) em músculo mandibular de *C. granulatus* onde a conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose foi significativamente menor no inverno quando comparada aos valores de verão. O retorno da capacidade gliconeogênica a valores semelhantes aos do grupo controle após 3 e 6 dias de estresse hiperosmótico refletiria o ajuste do volume celular à osmolaridade do meio. A participação da via gliconeogênica no processo de aclimação ao estresse hiper e hiposmótico foi demonstrada no hepatopâncreas e no músculo mandibular de *C. granulatus* (Oliveira e Da Silva, 2000; Schein et al., 2004). Entretanto, em músculo mandibular de *C. granulatus* submetido ao estresse hiperosmótico por 1 dia no inverno, foi verificado um aumento significativo da conversão do  $^{14}\text{C}$ -alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose, da atividade e dos níveis de RNAm da PEPCK (Schein et al., 2005). Estes resultados sugerem que em *C. granulatus* os mecanismos de ajuste metabólico ao estresse hiperosmótico diferem entre os tecidos. Talvez isto esteja relacionado à função exercida por cada órgão na homeostase deste animal durante o processo de osmorregulação.

No inverno, a manutenção da concentração de lipídios totais nas brânquias anteriores e posteriores durante o estresse osmótico sugere que os lipídios totais não estariam sendo utilizados como substrato energético durante o processo de aclimação

ao estresse hiperosmótico. Contrariamente, Luvizzoto-Santos et al. (2003), estudando a mesma espécie, observaram um aumento na concentração de lipídios totais em brânquias após 7 dias de estresse hiperosmótico, contudo, os autores mantiveram os animais em jejum durante o período experimental. Além disso, esses autores submeteram os caranguejos a um estresse hiperosmótico de 40‰.

O estresse hiperosmótico no inverno não alterou significativamente a concentração de lipídios totais no músculo do *C. granulatus*. Entretanto, os valores de lipídios na hemolinfa diminuíram significativamente após 1 dia em meio hiperosmótico. Esta diminuição hemolinfática da concentração de lipídios totais foi acompanhada pelo aumento dos níveis de lipídios totais no hepatopâncreas. No presente estudo os resultados sugerem que os lipídios hemolinfáticos estariam sendo utilizados no hepatopâncreas como substrato energético durante a primeira fase do processo de aclimação ao meio hiperosmótico. O retorno da concentração de lipídios totais no hepatopâncreas e na hemolinfa a valores semelhantes aqueles do grupo controle após 3 e 6 dias de estresse osmótico reforça esta suposição. Nery et al. (1993), estudando a mesma espécie de caranguejo, verificaram que a utilização de carboidrato como substrato energético durante o estresse hiperosmótico de 40‰ ocorreu somente a partir do 3º dia de estresse osmótico no inverno.

No verão a capacidade de conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose e a concentração de lipídios totais nas brânquias anteriores e na hemolinfa não foram alteradas significativamente pelo estresse hiperosmótico de 6 dias. Entretanto, em brânquias posteriores, 3 dias em meio hiperosmótico reduziram em cerca de 34% a conversão do [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose. Também em músculo mandibular de *C. granulatus* 1 dia de estresse hiperosmótico, no verão, diminuiu em cerca de 50% a capacidade de conversão de [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose e a atividade da PEPCK

mitocondrial (Schein et al., 2005). Estes resultados comprovam a participação da via gliconeogênica como uma das vias envolvidas no ajuste metabólico durante a aclimatação ao meio hiperosmótico em brânquias de *C. granulatus*.

A concentração de lipídios totais em brânquias posteriores de caranguejos no verão diminuiu em cerca de 50% após 3 e 6 dias de estresse hiperosmótico. A concentração de lipídios totais em brânquias posteriores de *C. granulatus* foi 100% maior do que aquela verificada nas brânquias anteriores. A utilização dos lipídios totais como substrato energético durante a fase final do período experimental de estresse osmótico explicaria o aumento das concentrações de glicose livre e glicogênio em brânquias nos primeiros dias (1-3 dias) de estresse hiperosmótico constatado por Nery et al. (1993) no verão. Apesar da utilização dos lipídios totais como fonte energética durante a aclimatação ao meio hiperosmótico os valores são semelhantes aqueles verificados no grupo controle das brânquias anteriores.

Nery et al. (1993) submetendo o *C. granulatus* durante 15 dias ao estresse hiperosmótico verificaram um aumento das concentrações de glicose livre e glicogênio no músculo e nenhuma alteração significativa destes parâmetros no hepatopâncreas no verão. A diminuição gradual da concentração de lipídios totais no músculo e hepatopâncreas constatada neste estudo, sugere a utilização dos lipídios totais como fonte energética durante a aclimatação ao estresse hiperosmótico no verão nestes tecidos.

Concluindo, este estudo demonstrou a capacidade da síntese de [<sup>14</sup>C]-glicose a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus*. A capacidade gliconeogênica foi maior no verão do que no inverno em ambos os tecidos. A participação da via gliconeogênica no ajuste metabólico ao estresse hiperosmótico foi evidenciada em brânquias posteriores pela diminuição da conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol

em [<sup>14</sup>C]-glicose no 3º dia de estresse no verão e, em ambas as brânquias, no 1º dia de estresse no inverno. No verão, a diminuição da concentração de lipídios totais durante o estresse hiperosmótico nas brânquias posteriores, no hepatopâncreas e no músculo sugere a utilização desse substrato como fonte energética durante a aclimação ao estresse.

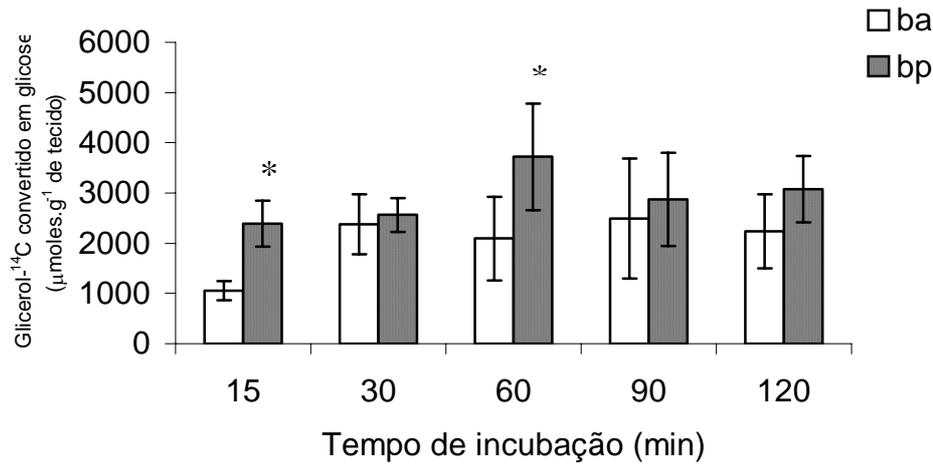


Fig. 1: Efeito de diferentes tempos de incubação sobre a conversão de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose nas brânquias anteriores (ba) e posteriores (bp) de animais mantidos em aquários a 20%. Os dados estão representados como média ± desvio padrão; n =3-6. \* média com diferença significativa entre os tecidos (P<0.05).

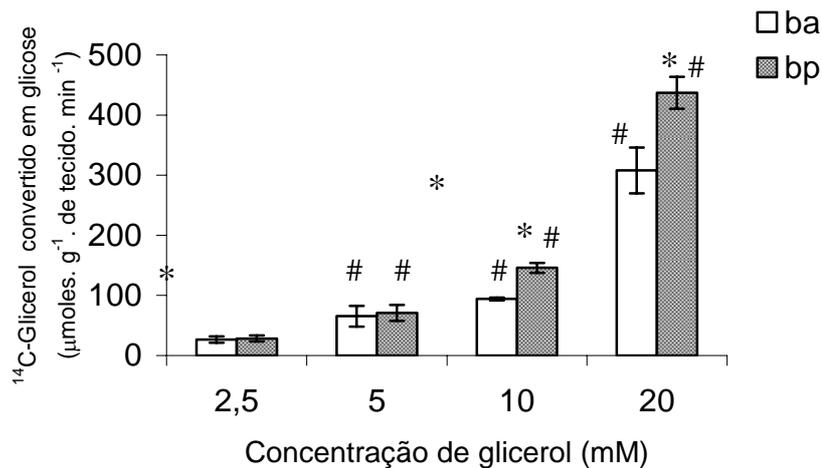


Fig. 2: Efeito de diferentes concentrações de glicerol no meio de incubação sobre a conversão de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose, nas brânquias anteriores (ba) e posteriores (bp) de animais mantidos em aquários a 20%. Os dados estão representados como média ± desvio padrão; n =3-4. \* média com diferença significativa entre os tecidos (P<0.05); # média com diferença significativa em relação ao grupo 2.5 mM (P<0.05).

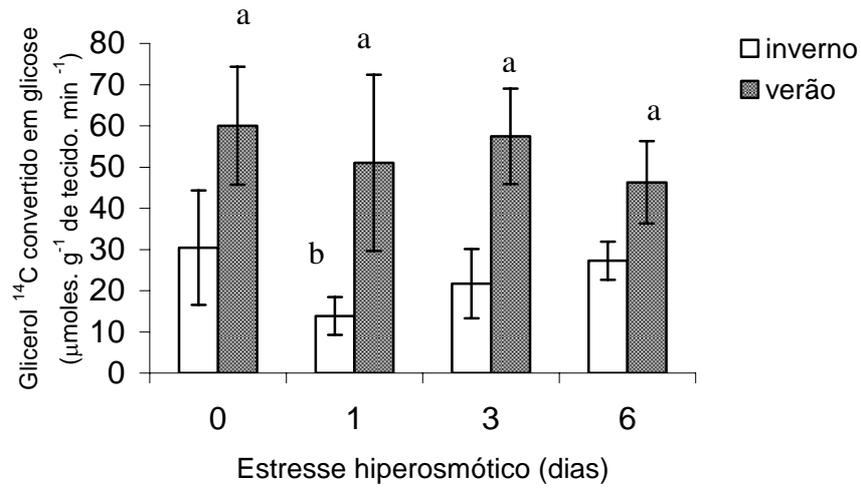
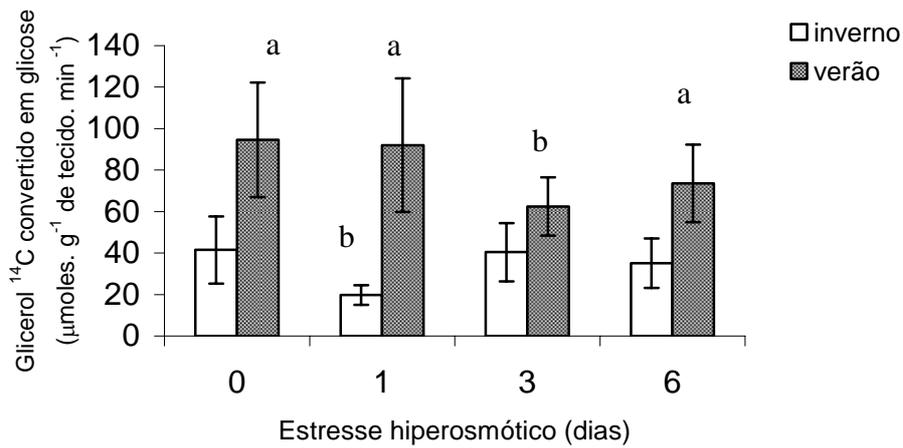
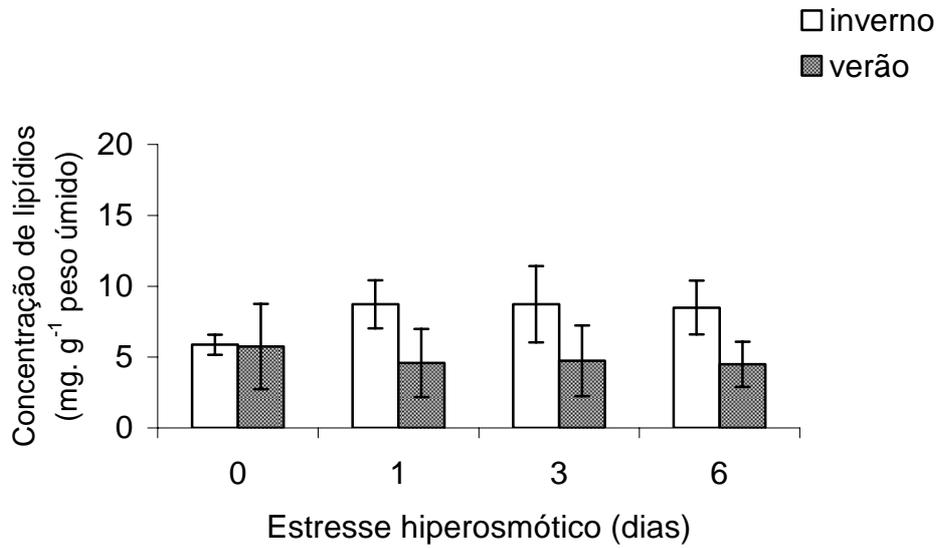
**A****B**

Fig. 3: Gliconeogênese em brânquias anteriores (A) e em brânquias posteriores (B) de *C. granulatus* submetido ao estresse hiperosmótico durante 0, 1, 3 e 6 dias no inverno e no verão. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 5-9; <sup>a</sup> média com diferença significativa entre as estações (P<0.05); <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle (P<0.05).

**A**



**B**

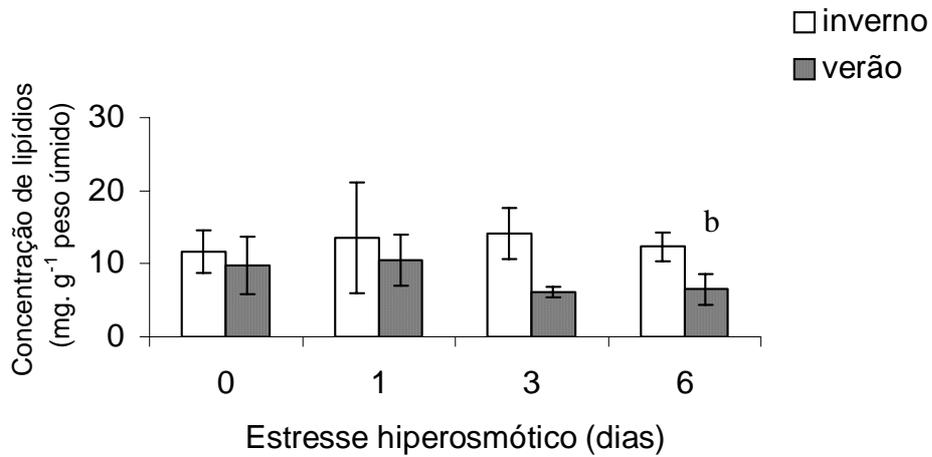


Fig. 4: Concentração de lipídios totais em brânquias anteriores (A) e em brânquias posteriores (B) de caranguejos *C. granulatus* submetidos ao estresse hiperosmótico no inverno e no verão durante 0, 1, 3 e 6 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n =4-8; <sup>a</sup> média com diferença significativa entre as estações (P<0.05); <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle (P<0.05).

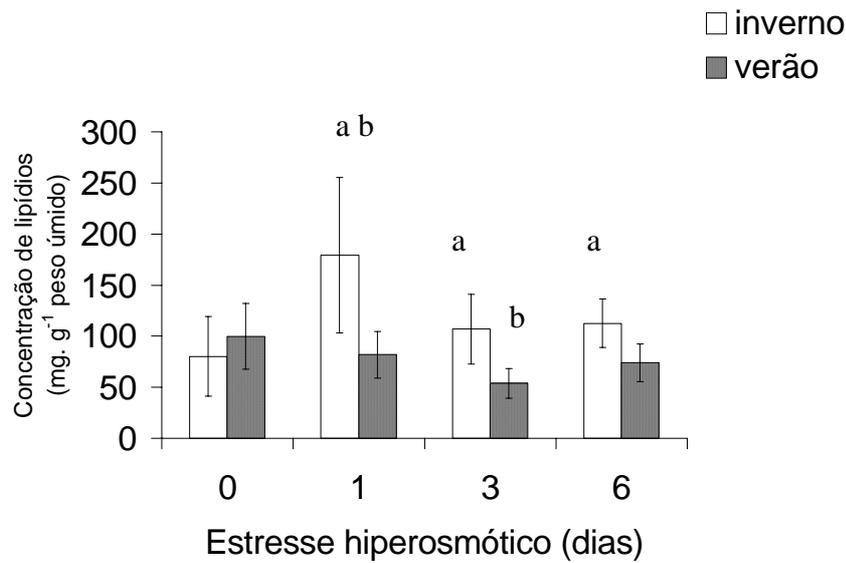
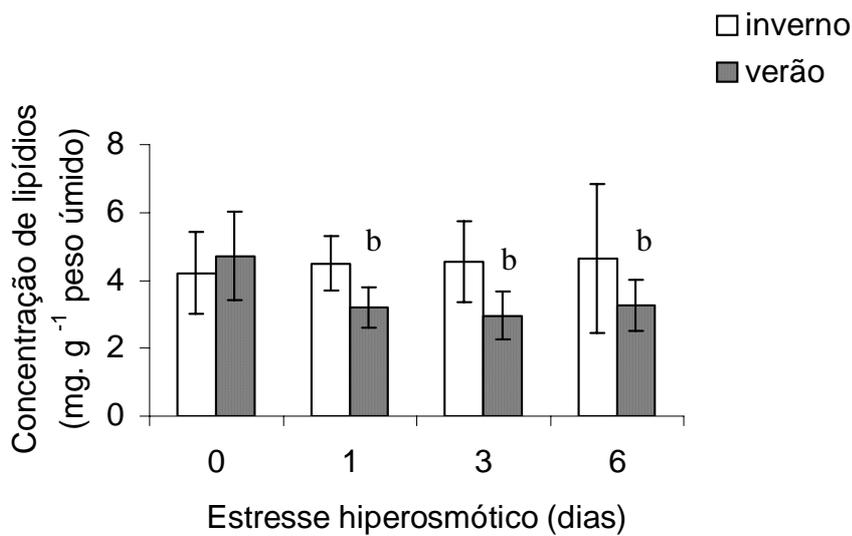
**A****B**

Fig. 5: Concentração de lipídios totais no hepatopâncreas (A) e no músculo da quela (B) de caranguejos *C. granulatus* submetidos ao estresse hiperosmótico no inverno e no verão durante 0, 1, 3 e 6 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n =5-10; <sup>a</sup> média com diferença significativa entre as estações (P<0.05); <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle (P<0.05).

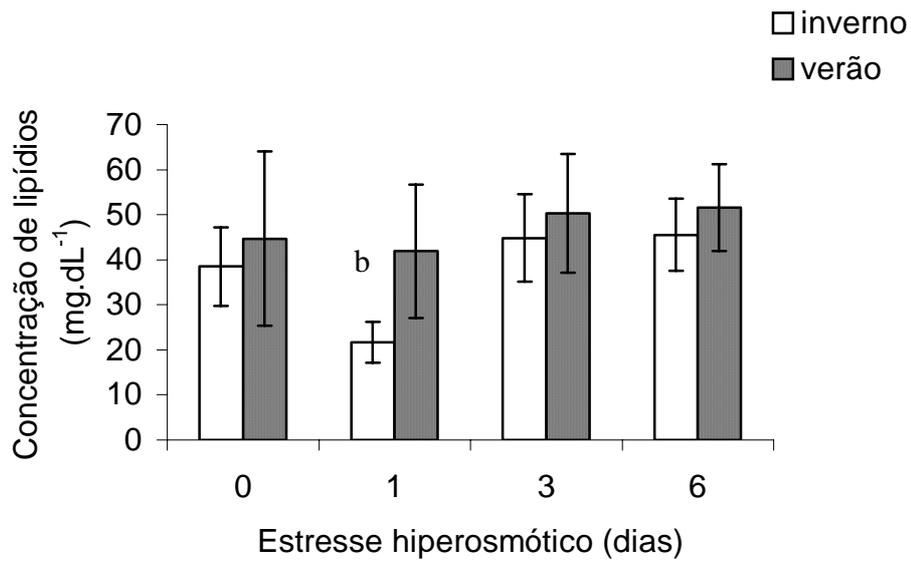


Fig. 6: Concentração de lipídios totais na hemolinfa de caranguejos *C granulatus* submetidos ao estresse hiperosmótico no inverno e no verão durante 0, 1, 3 e 6 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 4-9; <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle, (P<0.05).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, C. E.; Tyler, P. A. e Varney M. S. (2000) Lipid profiles of *Nematocarcinus gracilis* a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. **Hydrobiologia**. 440 (1-3): 273-279.
- Bishop, S.H.; Burton, R.S. 1993. Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 106 A (1): 49-56.
- Chittó (2000) **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Drach, F. e Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Millieu**, **161**: 595-607.
- Folch, J.; Lees, M. e Stanley, H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226:497-503.
- Garcia, F.; Gonzalez-Baro, M.; Pollero, R. (2002) Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borelli*. **Lipids** 37 (6): 581-585.
- Gilbert, L. I. e O'Connor, J. D. (1970) Lipid metabolism and transport in arthropods. In **Chemical Zoology** (Edited by Florkin M. and Scherr, B. T.) Part 5, Vol. 1 pp 229-254. Academic Press, New York.
- Gilles, R. (1982) Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, **6**:1-36.
- Gilles, R. (1997) “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** **117A**: 279-290.
- Gilles, R. e Delpire, E. (1997) Variations in salinity, osmolarity, and water availability: Vertebrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed). **Handbook of comparative physiology**. Oxford University Press, New York, Oxford, p. 1523-1586.
- Hasek, B. E. e Felder, D. L. (2005) Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopancreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. Reticulatum* (Crustacea, Decapoda) **Comp. Biochem. Physiol. B** 140(3): 455-463.
- Hervant F, Garin D, Mathieu J, Frèminet, A. (1999) Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. **J. of Exp. Biol.** 202 (5): 579-592.

- Hill, A. D.; Taylor, A. C.; Strang, R. H. C. (1991) Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 150:31-50.
- Jeckel, W. H.; Demoreno, J. E. A.; Moreno, V. J. (1991) Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. **Comp. Biochem. Physiol., B 98**: 253-260.
- Jeuniaux, C. and Florkin, M., (1961). Modification de l'excretion azotée du crabe chinois au cours de l'adaptation osmotique. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, 69, 385-386.
- Johnston, M.A. e Davies, P.S. (1973) Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 41 B: 433-443.
- Kasschau, M.R.; Skisak, C.M.; Cook, J.P. e Mills, W.R. (1984)  $\beta$ -Alanine metabolism and high salinity stress in the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*. **J. Comp. Physiol.**, 154 B: 181-186.
- Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. (1991a) Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, 100 A (3): 599-602.
- Kucharski, L.C.R. e Da Silva, R.S.M. (1991b) Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, 99A: 215-218.
- Lallier, F.H. e Walsh, P. (1991) Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bul. Marine Science**, 48(3): 665-669.
- Luvizzotto-Santos R.; Lee, J. T.; Branco, Z. P. Bianchini, A. e Nery, L. E. M. (2003) Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea – Grapsidae). **J. Exp. Zool.** 295A: 200-205.
- Matsushima, O; Hayashi, Y.S. 1992. Metabolism of D e L-alanina and regulation of intracellular free amino acids levels during salinity stress in a brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. **Comp. Biochem. Physiol.** 102A; 465-471.
- Nery, L.E.M; Santos, E.A.; Bianchini, A.; Gonçalves, A.A. (1993). Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 26:1291-1296.
- Okuma, E, Abe, H. 1994. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109 A (1): 191-197.
- Oliveira, G. T.; Da Silva, R. S. M. (2000). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127 B, 375-381.

- Oliveira, G.T. e Da Silva, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, **118 A** (4): 1429-1435.
- Pillet, S.C, Henry, R.P., Doeller, J.E e Krauss, D.W. (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.
- Rosas, C; Cuzon, G; Gaxiola, G; Le Priol, Y; Pascual, C; Rossignol, J; Contreras, F.; Sanchez, A; Van Wormhoudt, A. (2001) Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 259: 1-22.
- Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 316: 203-212.
- Schein, V.; Waché, Y.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2004) Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters** 561: 202-206.
- Thabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, **40B**: 531-541.
- Turcato, G.S. (1990) **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.
- Van Aardt, WJ (1988) Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Patomonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. **Comp. Biochem. Physiol.** 91A: 299-304.

## CAPÍTULO 2

Efeito do estresse hiposmótico sobre a gliconeogênese em brânquias e sobre a concentração de lipídios totais na hemolinfa e nos tecidos de *C. granulatus*: no inverno e no verão

Autores: Ana Lúcia F. Chittó; Vanessa Schein; Rodrigo Etges; Luiz C. Kucharski; Roselis, S. M. da Silva.

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

Periódico: Comparative Biochemistry and Physiology Part A – Molecular and Integrative Physiology

## RESUMO

Em músculo de *C. granulatus* a resposta da via gliconeogênica ao estresse osmótico pode ser modificada pelas variações sazonais ambientais. Com o propósito de esclarecer a participação da gliconeogênese e dos lipídios no ajuste metabólico durante o estresse osmótico, foi verificada, *in vitro*, a conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose em brânquias posteriores e anteriores de *C. granulatus* submetidos ao estresse hiposmótico no inverno e no verão. A capacidade gliconeogênica em brânquias anteriores do grupo controle foi 97% maior no verão quando comparada ao inverno. Em brânquias posteriores, a capacidade gliconeogênica do grupo controle foi 128% maior no verão quando comparada ao inverno. Nesse tecido a conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose diminuiu 46% e 40% aos 3 e 6 dias, respectivamente, de estresse hiposmótico no verão. No grupo controle, a capacidade gliconeogênica das brânquias posteriores foi 58% maior do que aquela das brânquias anteriores no verão. Contudo, no inverno, ambas as brânquias apresentaram a mesma capacidade gliconeogênica. Em brânquias posteriores a concentração de lipídios totais foi aproximadamente 100% maior que aquela constatada nas brânquias anteriores no inverno e verão. No inverno, a concentração de lipídios totais nas brânquias posteriores aumentou 73% no 1º dia de estresse hiposmótico. No hepatopâncreas, no inverno, o estresse hiposmótico causou um aumento significativo da concentração de lipídios totais durante todo o período experimental. No verão, a concentração de lipídios totais não foi alterada pelo estresse hiposmótico nos tecidos estudados. Os resultados demonstram uma diferença sazonal na capacidade gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol em brânquias desse crustáceo. Entretanto, o glicerol parece não ser o substrato preferencial utilizado por essa dessa via durante o estresse hiposmótico, tanto no verão como no inverno. O aumento da concentração de lipídios totais nas brânquias e no hepatopâncreas sugere a participação da lipogênese no ajuste metabólico de aclimação ao estresse hiposmótico no inverno.

Palavras chave: *Chasmagnathus*, estresse hiposmótico, glicerol, gliconeogênese, lipídios totais

## INTRODUÇÃO

O *Chasmagnathus granulatus* é um caranguejo eurialino que habita as zonas meso e supra-litorâneas na costa sul do Brasil (Bond-Buckup et al., 1991) onde enfrenta variações de salinidade de 0,22 a 34‰ (Turcato, 1990). Conforme Bromberg (1992), o caranguejo *C. granulatus* pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, uma vez que suporta uma ampla variação de salinidade, sendo capaz de hiperregular de 0‰ a 20‰ e hiporregular em 40‰. Seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e verão, respectivamente.

Segundo Gilles (1982), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: (1) regulação anisomótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolaridade da hemolinfa independente da osmolaridade do meio externo; (2) regulação isosmótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolaridade do fluido e do volume intracelular, com o objetivo de mantê-lo isosmótico em relação ao fluido extracelular.

O processo de regulação anisomótica do fluido extracelular resulta de um balanço entre os fenômenos de efluxo e influxo de efetores osmóticos, principalmente íons. Os principais componentes fisiológicos desse balanço entre os efetores osmóticos e a água são a permeabilidade da superfície corporal e o transporte ativo, principalmente em brânquias, trato intestinal e órgãos excretores (Gilles e Delpire, 1997; Gilles, 1997).

O termo regulação isosmótica do fluido intracelular define os mecanismos responsáveis pelo ajuste ativo da pressão osmótica intracelular em relação a novas pressões osmóticas dos fluidos corpóreos, impedindo assim grandes alterações na concentração intracelular (Jenieux e Florkin, 1961).

Em crustáceos há diversos estudos sobre a utilização do metabolismo de lipídios como reserva de energia durante a embriogênese e o período reprodutivo (Sibert e cols., 2004; Rosa e cols., 2005; Calado e cols., 2005; Rosa e Nunes, 2003). O hepatopâncreas parece ser o órgão envolvido em armazenar e fornecer lipídios durante o período reprodutivo nesses animais (Jeckel e cols., 1991; Hasek e Felder, 2005). Entretanto há poucos estudos sobre a utilização de lipídios como substrato energético para a osmorregulação. Recentemente, foi constatado em *C. granulatus* que a concentração de lipídios totais nas brânquias e no músculo foi significativamente menor em caranguejos submetidos a sete dias de estresse hiposmótico do que naqueles submetidos ao mesmo período de estresse hiperosmótico ou mantidos em condições controle. Já as reservas lipídicas do hepatopâncreas não foram mobilizadas durante o estresse osmótico (Luvizzotto-Santos et al., 2003).

Em *C. granulatus*, Kucharski e Da Silva (1991 a) constataram que as reservas de lipídios são elevadas no hepatopâncreas (20% do peso do tecido) e diminuem significativamente somente no outono. A maior concentração de lipídios no músculo ocorre no verão e diminui no outono e inverno. Os autores sugerem que as reservas de lipídios musculares seriam o principal substrato energético durante o outono e o inverno e que os lipídios do hepatopâncreas seriam utilizados no período reprodutivo (primavera, verão e outono).

A hidrólise de triacilglicerol resulta em ácidos graxos e glicerol, sendo este último um importante substrato para a gliconeogênese, via responsável pela produção e exportação de glicose também a partir de precursores como os aminoácidos, o lactato, o piruvato e o propionato. Esta via é filogeneticamente muito antiga, encontrada desde fungos até mamíferos (Moon, 1988). Em mamíferos, a gliconeogênese foi constatada no fígado, nos rins e no intestino (Marks et al., 1996; Habold et al., 2005), contudo, em *C.*

*granulatus* sua presença foi verificada no músculo, nas brânquias e no hepatopâncreas. (Schein et al., 2004; Chittó, 2000; Oliveira e Da Silva, 1997). A enzima chave dessa via, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), foi clonada (AY074922) e sua expressão determinada no hepatopâncreas, no músculo, no sistema nervoso, nas brânquias e no coração de *C. granulatus* (Schein et al., 2004).

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram, em *C. granulatus*, o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática na adaptação ao estresse hiposmótico. Os autores sugerem que os aminoácidos liberados dos diferentes tecidos durante o estresse hiposmótico seriam desaminados no hepatopâncreas e as cadeias de carbono utilizadas como substrato para a via gliconeogênica (Oliveira e Da Silva, 2000). Recentemente, foi demonstrado que a atividade, a expressão do gene da PEPCK e a conversão de [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose em músculo de *C. granulatus*, submetido ao estresse hipo- ou hiperosmótico, apresentam variação sazonal. No inverno, a capacidade gliconeogênica, a atividade e a expressão do gene da PEPCK no músculo são extremamente baixas quando comparadas aos resultados obtidos no verão (Schein et al., 2005a). No camarão *Litopenaeus vannamei* a atividade da PEPCK hepatopancreática aumentou quando os animais foram submetidos à baixa salinidade (Rosas et al., 2001). Assim, em crustáceos eurialinos a gliconeogênese seria uma das vias envolvidas no mecanismo de aclimação às alterações de salinidade ambiental.

Com o propósito de esclarecer a participação da gliconeogênese e dos lipídios totais no ajuste metabólico durante o estresse osmótico, foi verificada, *in vitro*, a conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em <sup>14</sup>C-glicose em brânquias posteriores e anteriores de *C. granulatus* submetidos ao estresse hiposmótico por 1, 3 e 6 dias e as concentrações de lipídios totais das brânquias (posteriores e anteriores), do músculo, do hepatopâncreas e da hemolinfa nos mesmos tempos de estresse estudados. Entretanto, em *C. granulatus* a

resposta da via gliconeogênica ao estresse hiposmótico pode ser modificada pelas variações sazonais (Schein et al., 2005a). Assim, este estudo comparou as diferenças, entre inverno e verão, dos parâmetros estudados.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Caranguejos *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea – Decapoda - Varunidae) machos (n=100), adultos no período de intermuda (Drach e Tchernigovtzeff, 1967), pesando 15 a 17 g, foram coletados na Lagoa Tramandaí, Rio Grande do Sul (coordenadas 29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste), em marisma tipicamente estuarino. Em seu habitat, Turcato (1990) verificou que o teor de O<sub>2</sub> dissolvido na água varia entre 2,78 a 11,78 mgO<sub>2</sub>/L e a salinidade oscila de 0,22 a 34‰ ao longo do ano.

No laboratório, os animais foram colocados em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante. Durante duas semanas os caranguejos foram alimentados, *ad libitum*, diariamente com carne bovina.

### **Procedimentos experimentais**

Após as duas semanas de aclimação ao laboratório, um grupo de caranguejos foi transferido para um aquário com água destilada (salinidade de 0‰), onde permaneceram durante 1, 3 e 6 dias. Durante os períodos de estresse, os animais foram mantidos em aquários com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, aeração e

alimentação do período de aclimação, recebendo alimento até 16 horas antes de serem sacrificados.

Os animais do grupo controle foram mantidos em aquários nas condições de aclimação e estes caranguejos foram sacrificados juntamente com os animais dos demais grupos experimentais. A salinidade foi determinada por meio de um refratômetro (ATAGO S/MILL). Os experimentos foram realizados no inverno (junho, julho e agosto) e verão (dezembro, janeiro e fevereiro) de 2001 a 2003.

### **Gliconeogênese**

Os animais submetidos aos diferentes tempos de estresse hiposmótico e os animais do grupo controle foram crioadestesiados por 10 minutos e amostras de 50 a 100mg de brânquias anteriores e posteriores foram removidas e colocadas em placas de Petry contendo solução fisiológica de caranguejo (SFC). Foram feitos pequenos cortes nas lamelas das brânquias, e as artérias aferente e eferente foram retiradas para possibilitar maior contato do tecido com o meio de incubação. A seguir as amostras foram colocadas em tubos com 500µl de SFC contendo: 300 mM de NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 8,8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES e 0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), pH 7,8 e 691 mOsm/ Kg de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a osmolalidade da hemolinfa em 20‰ é de 777 ± 51,04 mOsm/kg de H<sub>2</sub>O e de 736 ± 16,02 mOsm/Kg de H<sub>2</sub>O em 0‰). Ao meio de incubação dos dois grupos experimentais foi adicionado 0,2 µCi de [U-<sup>14</sup>C]-glicerol (Amersham Pharmacia Biotech, 5.25GBq/mmol, 142mCi/mmol) e 5 mM de glicerol (GibcoBRL). A seguir, foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff por 30 minutos sob agitação

constante a 25°C. A concentração de glicerol e o tempo de incubação foram escolhidos a partir de experimentos anteriores, onde foi feita uma curva com concentrações crescentes de glicerol (2,5; 5; 10 e 20 mM) e uma curva de tempo de incubação (15, 30, 60, 90 e 120 minutos) (Chittó 2005).

Decorrido o tempo de incubação, a conversão do [U-<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose pelas brânquias foi determinada por cromatografia segundo método descrito por Oliveira e Da Silva (1997). Os valores são expressos em  $\mu\text{moles de [U}^{14}\text{C]–glicerol convertido em [}^{14}\text{C] –glicose. g}^{-1}$  de tecido.  $\text{min}^{-1}$ .

### **Determinações bioquímicas**

Ao final dos períodos experimentais de 1, 3 e 6 dias de estresse hiposmótico, amostras de hemolinfa, de brânquias anteriores e posteriores, de hepatopâncreas e de músculo da quela foram utilizadas para determinação de lipídios totais.

Para a extração de lipídios totais as amostras foram homogenizadas em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v) (Folch et al. 1957). Os ácidos graxos liberados por hidrólise frente ao ácido sulfúrico reagem com a vanilina (Kit Lipídios totais Doles Reagentes) e a reação foi medida em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) em 530 nm.

### **Tratamento estatístico**

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão da média (média  $\pm$  DPM). Os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Dos dados obtidos, a comparação entre dois grupos foi feita pelo teste T de Student. Para a

comparação entre vários grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) ou duas vias seguidas pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o programa SigmaStat para Windows.

## RESULTADOS

A capacidade gliconeogênica em brânquias anteriores do grupo controle (20‰) foi 100 % maior no verão ( $P < 0.05$ ) quando comparada ao inverno (Fig.1A). Nesse tecido não houve variações significativas da capacidade gliconeogênica ao longo do estresse hiposmótico tanto no inverno como no verão (Fig. 1A).

Em brânquias posteriores, a capacidade gliconeogênica do grupo controle (20‰) foi 128 % maior no verão ( $P < 0.05$ ) quando comparada ao inverno (Fig. 1B). A Fig. 1B mostra que não houve variações significativas da conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose ao longo do estresse hiposmótico no inverno. Porém, no verão, a capacidade gliconeogênica diminuiu 46% e 40% ( $P < 0.05$ ) após 3 dias e 6 dias, respectivamente, de estresse hiposmótico.

No verão, no grupo controle, a capacidade gliconeogênica das brânquias posteriores foi 58 % maior ( $P < 0.05$ ) do que aquela das brânquias anteriores (Fig.1 A e B). Contudo, no inverno, ambas as brânquias apresentaram a mesma capacidade de conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose (Fig. 1 A e B).

Não foram verificadas diferenças na concentração de lipídios totais entre as estações do ano. Também, o estresse hiposmótico não causou alterações significativas na concentração de lipídios totais na hemolinfa (Fig. 2).

Fig. 3A mostra que, no grupo controle, não houve variações significativas da concentração de lipídios totais nas brânquias anteriores entre o inverno e o verão. O estresse hiposmótico não alterou significativamente a concentração de lipídios totais nas brânquias anteriores tanto em animais de inverno como naqueles de verão.

Em brânquias posteriores (inverno e verão) do grupo controle, a concentração de lipídios totais foi cerca de 100% maior que aquela constatada nas brânquias anteriores de inverno e verão (Fig. 3 A e B). Também, no grupo controle, não foi constatada diferença sazonal na concentração de lipídios totais nas brânquias posteriores. Entretanto, no inverno, a concentração de lipídios totais nas brânquias posteriores aumentou ( $P < 0,05$ ) 73 % após 1 dia de estresse hiposmótico, retornando aos níveis do grupo controle após 3 e 6 dias de estresse osmótico. No verão, não houve variações significativas dos níveis de lipídios em brânquias posteriores ao longo do período de estresse hiposmótico estudado (Fig. 3B).

No hepatopâncreas não foi constatada diferença significativa entre o inverno e o verão na concentração de lipídios totais no grupo controle (Fig. 4 A). No inverno o estresse hiposmótico aumentou significativamente a concentração de lipídios totais a partir do terceiro dia de estresse osmótico, chegando a valores 135% ( $P < 0.05$ ) maiores daqueles do grupo controle no 6º dia de tratamento (Fig. 4 A). No verão, a concentração de lipídios totais não foi alterada pelo estresse hiposmótico (Fig. 4 A).

Tanto no inverno como no verão, não houve variações significativas na concentração de lipídios totais no músculo ao longo do estresse hiposmótico (Fig. 4 B). Não foi constatada diferença significativa na concentração de lipídios totais do músculo entre os animais controle de inverno e os de verão.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, a temperatura, a salinidade, a pressão parcial de oxigênio, a composição e disponibilidade de alimento foram controladas; somente o fotoperíodo era natural para cada estação do ano. No inverno, a conversão do [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose nos animais controle foi marcadamente reduzida em ambas as brânquias em relação ao verão. Estes dados são concordantes com estudo prévio em *C. granulatus* que demonstrou que a atividade e a expressão da enzima PEPCK e a capacidade gliconeogênica do músculo mandibular diminuem significativamente no inverno (Schein et al., 2005a). No verão, a conversão do [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose em ambas as brânquias aumentou, porém nas brânquias posteriores a atividade gliconeogênica foi superior àquela das brânquias anteriores. O envolvimento da via gliconeogênica no processo de aclimação ao estresse osmótico foi demonstrado no hepatopâncreas e no músculo mandibular de *C. granulatus* (Oliveira e Da Silva, 2000; Schein et al., 2004). A maior atividade de conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose constatada em brânquias posteriores do grupo controle sugere que esta via estaria fornecendo glicose que seria utilizada como substrato energético para estes pares de brânquias que constituem o principal órgão osmorregulador de crustáceos eurialinos (Péqueux, 1995).

Experimentos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que a redução dos compostos nitrogenados intracelulares durante o estresse hiposmótico pode envolver diminuição dos processos de biossíntese de aminoácidos, aumento da degradação, efluxo ou redução na captação de aminoácidos celulares, aumento da incorporação de aminoácidos em proteínas ou outros produtos finais, ou ainda, a combinação de alguns destes mecanismos (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997).

No inverno, 6 dias de estresse hiposmótico não alterou significativamente a conversão do [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose em brânquias anteriores e posteriores. Entretanto, em brânquias de *Carcinus maenas* o estresse hiposmótico no inverno aumentou a produção de glicose, contudo, nesse experimento os autores utilizaram como precursor o piruvato ou só determinaram a glicose do meio sem utilizar um precursor específico para a gliconeogênese (Thabrew et al., 1971). Em músculo mandibular de *C. granulatus* submetido ao estresse hiposmótico por 6 dias, no inverno, também não foi verificada alteração significativa da incorporação de [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose nem dos níveis de RNAm da PEPCK (Schein et al., 2005a). Neste estudo, um aumento de cerca de 75% na concentração de lipídios totais, tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores, ocorreu no 1º dia de estresse hiposmótico nos animais de inverno. Na mesma espécie, Luvizzoto-Santos et al. (2003) observaram uma diminuição na concentração de lipídios em brânquias após 7 dias de estresse hiposmótico. Entretanto, os autores mantiveram os animais em jejum durante o período experimental, o que reduziu em cerca de 70% a concentração de lipídios nas brânquias. No presente trabalho, os animais foram alimentados ao longo de todo o período experimental. Desta forma, durante o estresse hiposmótico os aminoácidos livres das brânquias poderiam ser convertidos em acetil-CoA para síntese de ácidos graxos e triacilglicerol o que explicaria o aumento na concentração de lipídios totais constatado neste órgão no 1º dia de estresse osmótico. Os aminoácidos liberados dos diferentes tecidos também poderiam ser convertidos em ácidos graxos e triacilglicerol no hepatopâncreas durante o estresse hiposmótico, o que explicaria o aumento gradual da concentração de lipídios totais neste tecido ao longo dos 6 dias de estresse osmótico. Entretanto, no músculo e na hemolinfa não ocorreram variações significativas na concentração de lipídios totais. Reforçando esta hipótese, a alimentação por 15 dias com

uma dieta rica em proteínas aumenta em cerca de 30% a concentração de lipídios totais no hepatopâncreas, porém no músculo não foi constatada diferença significativa (Kucharski e Da Silva, 1991b). Por outro lado, o estresse hiposmótico não diminuiu a captação de aminoácidos pelo hepatopâncreas o que corrobora com a hipótese da importância deste órgão no ajuste metabólico ao estresse osmótico em *C. granulatus* (Schein et al., 2005b). Contudo, a determinação da capacidade lipogênica, utilizando-se aminoácidos como precursores ou com  $^3\text{H}_2\text{O}$ , durante o estresse hiposmótico serão esclarecedores. Em mamíferos, a incubação de hepatócitos em meio hiposmótico estimula a lipogênese a partir de glicose e a atividade da acetil-CoA carboxilase, enzima-chave na síntese de ácidos graxos (Haussinger et al, 1994). Esses autores também verificaram que a lipogênese é estimulada pela glutamina, prolina e alanina, mas sugerem que a mudança de volume celular *per se* não é a principal responsável pelo efeito lipogênico dos aminoácidos.

No verão, a capacidade gliconeogênica das brânquias anteriores não apresenta alteração significativa ao longo dos 6 dias de estresse hiposmótico. Em músculo mandibular de *C. granulatus* o estresse hiposmótico no verão também não alterou significativamente a incorporação da [ $^{14}\text{C}$ ]-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose (Schein et al., 2005a). Entretanto, nas brânquias posteriores foi constatada uma redução gradual na conversão do [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose ao longo do período experimental. Chittó (2000) verificou uma redução na incorporação da [ $^{14}\text{C}$ ]-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose aos 3 dias de estresse osmótico (Chittó, 2000). Os dados sugerem que no verão, em brânquias posteriores, nem o glicerol e nem os aminoácidos seriam utilizados pela via gliconeogênica para produção de glicose como substrato energético ou na redução da concentração intracelular de aminoácidos necessária para a regulação do volume celular durante o estresse hiposmótico. Chittó (2000) também verificou uma diminuição

gradual da concentração de glicose livre em brânquias posteriores de *C. granulatus* submetido ao estresse hiposmótico por 6 dias no verão. Esta redução da capacidade gliconeogênica nas brânquias posteriores no verão, talvez reflita o aumento do efluxo de aminoácidos branquiais que seriam captados pelo hepatopâncreas, onde foi verificado um aumento da capacidade gliconeogênica após 6 dias de estresse hiposmótico no verão (Oliveira e Da Silva, 2000).

Ao contrário do que ocorreu no inverno, os resultados obtidos no verão sugerem que a lipogênese no tecido branquial e no hepatopâncreas não seria ativada durante a aclimação ao estresse hiposmótico, pois não ocorreu alteração significativa na concentração de lipídios totais em todos os tecidos estudados neste trabalho.

Concluindo, em brânquias anteriores e posteriores, durante o estresse hiposmótico, a via gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol não participa do ajuste metabólico ao estresse osmótico tanto em animais de inverno como naqueles de verão. O aumento da concentração de lipídios totais nas brânquias e no hepatopâncreas sugere a participação da lipogênese no ajuste metabólico de aclimação ao estresse hiposmótico no inverno.

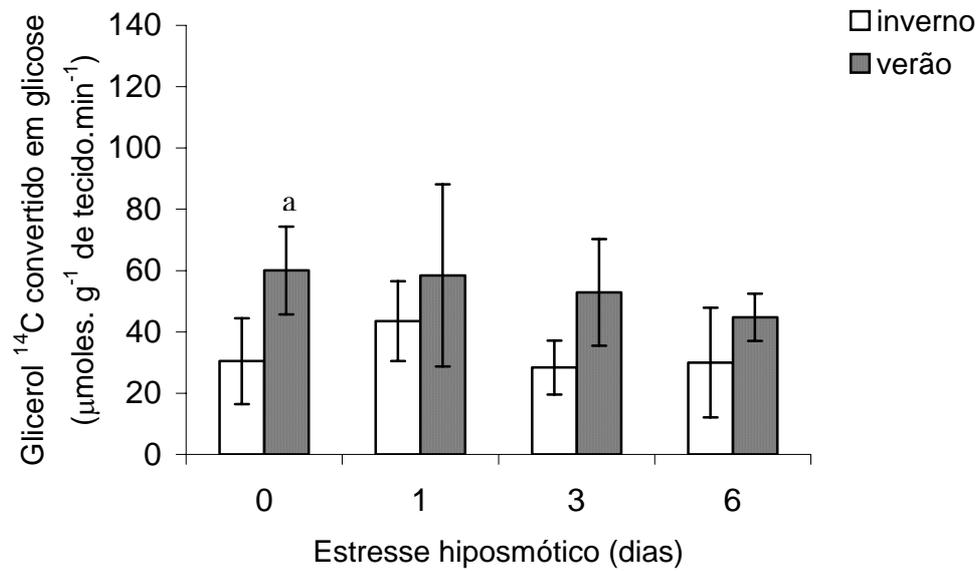
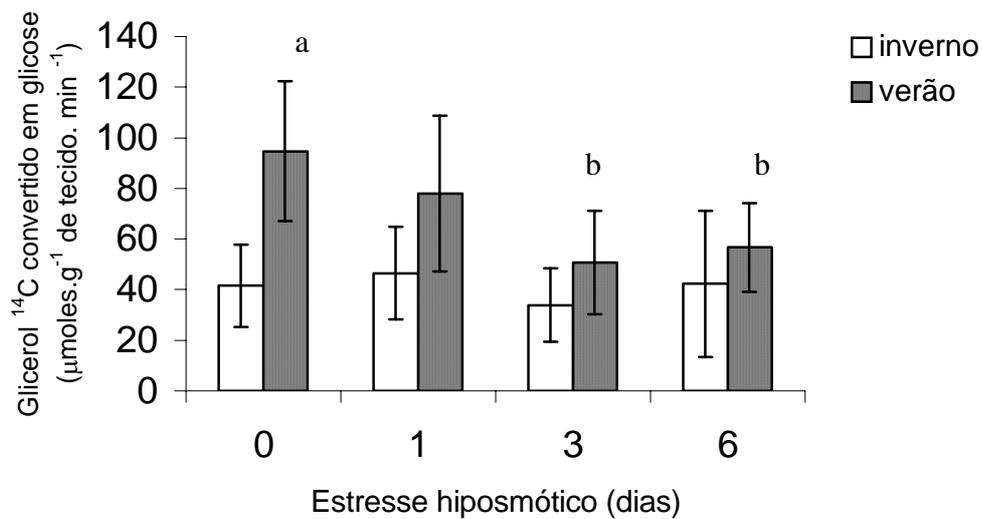
**A****B**

Fig. 1: Gliconeogênese em brânquias anteriores (A) e em brânquias posteriores (B) de *C. granulatus* submetido ao estresse hiposmótico durante 0, 1, 3 e 6 dias no inverno e no verão. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 5-9; <sup>a</sup> média com diferença significativa entre as estações ( $P < 0.05$ ); <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle.

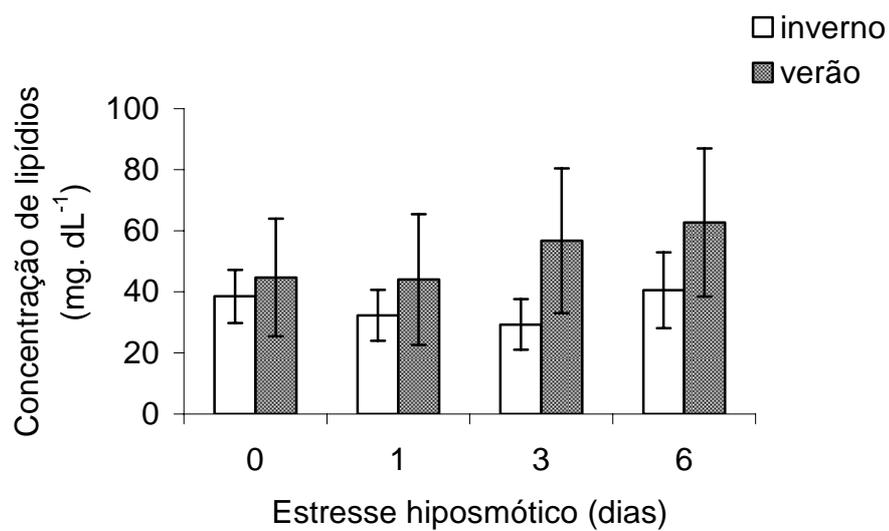
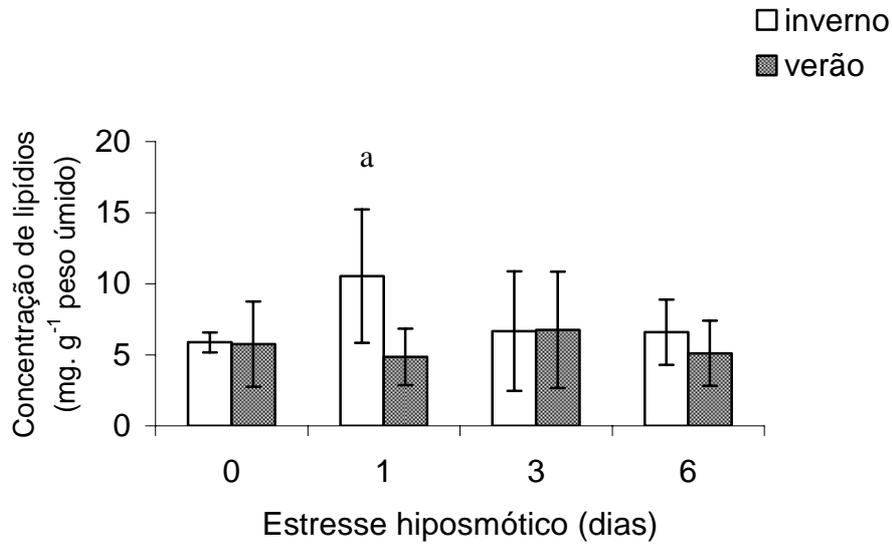


Fig. 2: Concentração de lipídios totais na hemolinfa de caranguejos *C. granulatus* submetidos ao estresse hiposmótico no inverno e no verão durante 0, 1, 3 e 6 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n = 4-9.

**A**



**B**

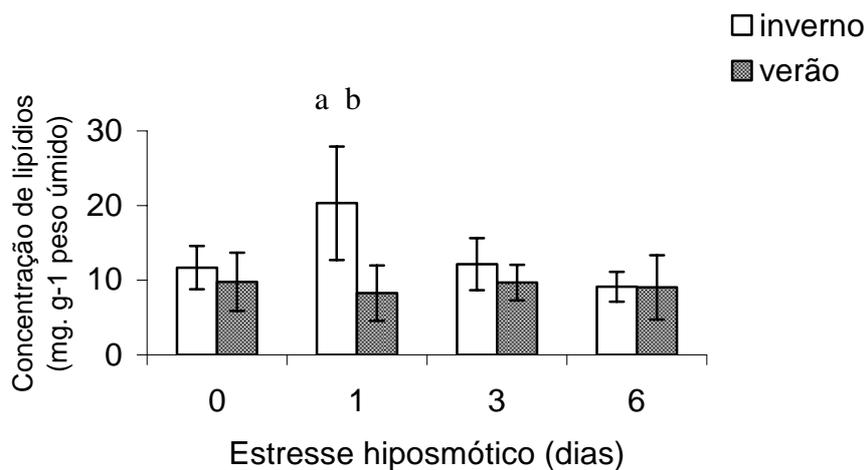
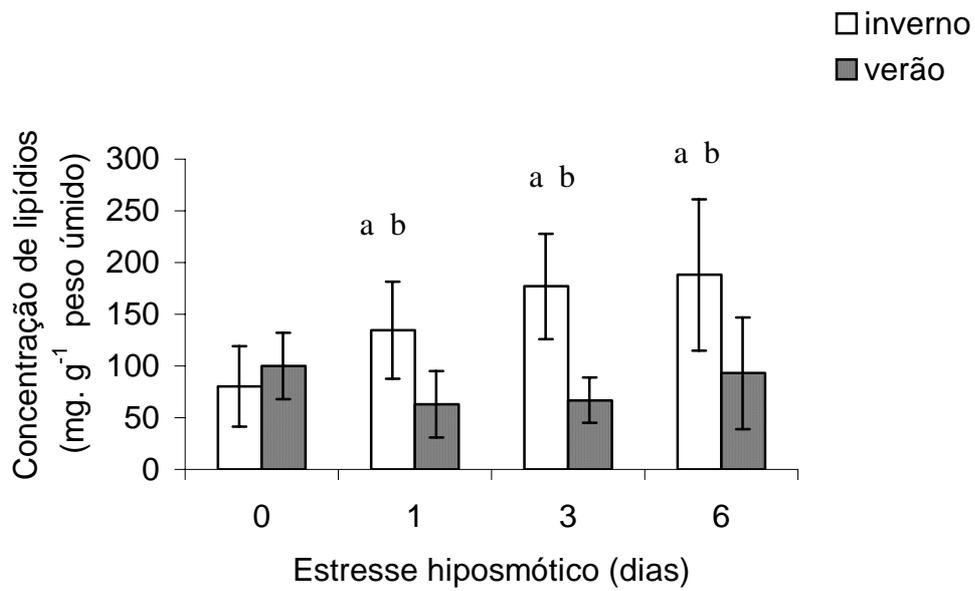


Fig. 3: Concentração de lipídios totais em brânquias anteriores (A) e em brânquias posteriores (B) de caranguejos *C. granulatus* submetidos ao estresse hiposmótico no inverno e no verão durante 0, 1, 3 e 6 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n =4-8; <sup>a</sup> média com diferença significativa entre as estações (P<0.05); <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle.

A



B

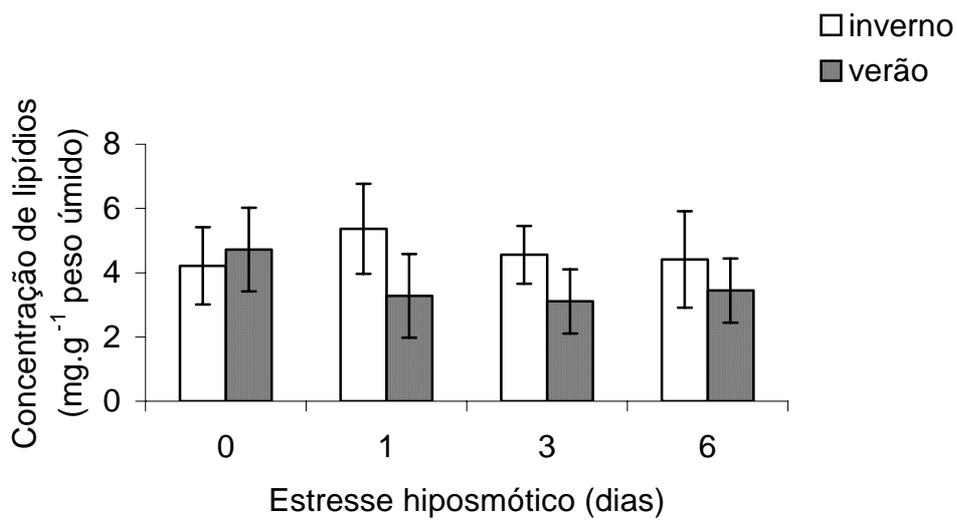


Fig. 4: Concentração de lipídios totais no hepatopâncreas (A) e no músculo da queila (B) de caranguejos *C. granulatus* submetidos ao estresse hiposmótico no inverno e no verão durante 0, 1, 3 e 6 dias. Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão; n =6-8; <sup>a</sup> média com diferença significativa entre as estações (P<0.05); <sup>b</sup> média com diferença significativa em relação ao grupo controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bond-Buckup, G.; Fontoura, N.F.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C. (1991) **O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia**. Editora da Universidade - UFRGS, Porto Alegre, 71 p.
- Bromberg, E (1992) **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão**. Rio Grande: FURG, 1992. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica)- Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Calado R.; Rosa, R.; Morais, S. Nunes, M. L. Narciso, L. (2005) Growth, survival, lipid and fatty acid profile of juvenile mônio shrimp *Lysmata seticaudata* fed on different diets. **Aquaculture Research** 36(5): 493-504.
- Chittó (2000) **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Chittó, A.L.F. (2005) **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Corssmit, EPM; Romijn, JÁ; Sawerwein, HP (2001) Regulation of glucose production with special attention to non-classical regulatory mechanisms: a review. **Metab. Clin. Exp.** 50: 742-755.
- Drach, F. e Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Millieu**, 161: 595-607.
- Folch, J.; Lees, M. e Stanley, H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226:497-503.
- Gilles, R. (1982) Osmoregulatory process in mollucs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, 6:1-36.
- Gilles, R. (1997) “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 117A: 279-290.
- Gilles, R. e Delpire, E. (1997) Variations in salinity, osmolarity, and water availability: Vertebrates and invertebrates. **In: Dantzeler, W.H. (ed). Handbook of comparative physiology**. Oxford University Press, New York, Oxford, p. 1523-1586.

- Habold C; Foltzer-Jourdainne C; Le Maho Y; Lignot, J; Oudart, H. (2005) Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. **Journal of Physiology-London**: 566 (2): 575-586.
- Hasek, B. E. e Felder, D. L. (2005) Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopâncreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. Reticulatum* (Crustacea, Decapoda) **Comp. Biochem. Physiol. B** 140(3): 455-463.
- Häussinger, D., Lang, F. and Gerok, W. 1994. Regulation of cell function by the cellular hydration state. **Am. J. Physiol.** 267, E343-E355.
- Jeckel, W. H.; Demoreno, J. E. A.; Moreno, V. J. (1991) Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. **Comp. Biochem. Physiol., B 98**: 253-260.
- Jeuniaux, C. and Florkin, M., (1961). Modification de l'excretion azotée du crabe chinois au cours de l'adaptation osmotique. **Arch. Int. Physiol. Biochim.**, 69, 385-386.
- Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. (1991a) Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol., 100 A** (3): 599-602.
- Kucharski, L.C.R. e Da Silva, R.S.M. (1991b) Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol., 99A**: 215-218.
- Luvizzotto-Santos R.; Lee, J. T.; Branco, Z. P. Bianchini, A. e Nery, L. E. M. (2003) Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea – Grapsidae). **J. Exp. Zool.** 295A: 200-205.
- Marks, D.B.; Marks, A.D.; Smith, C.M. (1996) **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Oliveira, G. T.; Da Silva, R. S. M. (2000). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chamagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127 B, 375-381.
- Oliveira, G.T. e Da Silva, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol., 118 A** (4): 1429-1435.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic regulation in Crustaceans. **J. Crust. Biol.** 15(1): 1-60.
- Rosa, R e Nunes, M L. (2003) Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies of the Portuguese, south coast. **Deep-sea Research part I.** 50 (1): 119-130.
- Rosa, R.; Calado, R.Andrade, AM; Narciso, L; Nunes, ML. (2005) Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol. B** 140 (2): 241-249.
- Rosas, C; Cuzon, G; Gaxiola, G; Le Priol, Y; Pascual, C; Rossignol, J; Contreras, F.; Sanchez, A; Van Wormhoudt, A. (2001) Metabolism and growth of juveniles of

- Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 259: 1-22.
- Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005a). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 316: 203-212.
- Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005b). Effects of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.** v.140, p.561-567.
- Schein, V.; Waché, Y.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2004) Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters** 561: 202-206.
- Sibert, V; Ouellet P; Brethes, JC. (2004) Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. **Marine Biology.** 144 (6): 1075-1086.
- Thabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, **40B**: 531-541.
- Turcato, G.S. (1990) **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

### CAPÍTULO 3

Atividade das enzimas glicose-6-fosfatase e frutose 1,6 bifosfatase em tecidos do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*: efeito do estresse osmótico

Autores: Ana Lúcia F. Chittó; Luiz C. Kucharski; Roselis, S. M. da Silva.

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

Periódico: Comparative Biochemistry and Physiology Part A – Molecular and Integrative Physiology

## RESUMO

Em *C. granulatus* a gliconeogênese provavelmente é uma das vias envolvidas no mecanismo de adaptação deste caranguejo às alterações da osmolaridade do meio. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade das enzimas glicose-6-fosfatase (G6Fase) e frutose-1,6-bifosfatase (FBFase) no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias de *C. granulatus* submetidos a 3 dias de estresse hipo ou hiperosmótico. A atividade da G6Fase no grupo controle foi significativamente mais elevada no hepatopâncreas do que nos outros tecidos. Nas brânquias anteriores, a atividade da G6Fase foi maior que nas brânquias posteriores nos animais do grupo controle. O estresse hiposmótico causou um aumento da atividade da enzima G6Fase somente no músculo. O estresse hiperosmótico causou um aumento da atividade dessa enzima no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias posteriores. Contrariamente, em brânquias anteriores, o estresse hiperosmótico diminuiu 80% a atividade da G6Fase. No grupo controle, a maior atividade da enzima FBFase foi verificada no hepatopâncreas. Em animais submetidos ao estresse hiperosmótico foi constatado um aumento de cerca de 2 vezes na atividade da FBFase em brânquias posteriores. Entretanto, no hepatopâncreas a atividade dessa enzima diminuiu cerca de 51% após o estresse hiperosmótico. O presente estudo demonstrou o papel da modificação do volume celular sobre a atividade das enzimas da via gliconeogênica em diferentes tecidos de crustáceo, evidenciando a participação desta via no ajuste metabólico durante a aclimação ao estresse osmótico em *C. granulatus*.

Palavras-chave: glicose-6-fosfatase, frutose-1,6-bifosfatase, gliconeogênese, estresse osmótico, *Chasmagnathus granulatus*

## INTRODUÇÃO

O *Chasmagnathus granulatus* é um caranguejo eurialino que vive em estuários de sedimento areno-lodoso, desde o Rio de Janeiro, no Brasil, até o Golfo de São Martin, na Argentina. Em seu habitat enfrenta variações de salinidade, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido na água. Esse crustáceo evoluiu de formas marinhas e é classificado como um regulador hiper-hiposmótico, apresentando hemolinfa hiposmótica em meio concentrado (40‰) e hemolinfa hiperosmótica em meio diluído (0‰ a 20‰) (Mañe-Gazon et al., 1974). Seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e no verão, respectivamente (Bromberg, 1992).

A gliconeogênese parece ser uma via universal, visto que suas enzimas são encontradas desde fungos até mamíferos como o homem. Em mamíferos essa via ocorre no fígado, nos rins e no intestino delgado (Marks et al., 1996; Mithieux et al., 2004; Habold et al., 2005). Em invertebrados, a precisa contribuição dessa via na manutenção da concentração de glicose hemolinfática difere conforme a espécie e a capacidade de adaptação bioquímica de cada organismo às mudanças dos níveis de glicose circulante (Moon, 1988; Habold et al., 2005).

As atividades das quatro enzimas-chave da gliconeogênese: piruvato carboxilase (PC, E.C. 6.4.1.1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, E. C. 4.1.1.32), frutose-1-6-bifosfatase (FBFase, E.C. 3.1.3.11) e glicose-6-fosfatase (G6Pase, E.C. 3.1.3.9) têm sido verificadas em uma variedade de espécies de vertebrados não mamíferos e invertebrados (Surholt e Newsholme, 1981; Moon, 1988).

A ocorrência da gliconeogênese e da neoglicogeniogênese em crustáceos, principalmente decápodes, já foi demonstrada utilizando-se [<sup>14</sup>C]-lactato e [<sup>14</sup>C]-amino

ácidos (Hill et al., 1991; Lallier e Wash, 1992; Henry et al., 1994; Oliveira e Da Silva, 1997; Hervant et al., 1999; Vinagre e Da Silva, 2002). O hepatopâncreas parece ser o principal local onde ocorre a gliconeogênese (Van Aardt, 1988; Hill et al., 1991; Lallier e Wash, 1992; Oliveira e Da Silva, 1997; Hervant et al., 1999), embora alguns estudos apontem a presença dessa via em brânquias (Thabrew et al., 1971; Chittó, 2000), hemócitos (Johnston et al. 1973). Recentemente, Schein et al. (2004) demonstraram a capacidade de conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose e a atividade da PEPCK no músculo mandibular; também verificaram a expressão do gene da PEPCK em hepatopâncreas, coração, brânquias e sistema nervoso de *C. granulatus*. Os autores caracterizaram a seqüência do cDNA da PEPCK (AY074922) no músculo mandibular desta espécie.

Em diferentes espécies de crustáceos foram detectadas em diversos tecidos atividades muito baixas das enzimas FBFase, G6Pase e PEPCK (Thabrew et al., 1971; Walsh and Henry, 1990; Lallier e Walsh, 1991; Henry et al., 1994; Hervant, 1996). Porém em *C. granulatus*, a atividade da PEPCK no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias é elevada quando comparada com aquela encontrada em outros crustáceos (Oliveira e Da Silva, 1997; 2000; Chittó, 2000; Schein et al., 2004; 2005).

A literatura consultada mostra poucos estudos envolvendo efeitos ambientais tais como a salinidade, teor de oxigênio dissolvido na água e fotoperíodo sobre a atividade da via gliconeogênica.

No hepatopâncreas de *C. granulatus*, Oliveira e Da Silva (2000) constataram aos 3 dias de estresse hiposmótico um aumento da conversão da [ $^{14}\text{C}$ ]-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose que foi acompanhado pela elevação da atividade da PEPCK. Estes autores sugerem que os aminoácidos liberados dos diferentes tecidos durante o estresse

hiposmótico seriam desaminados no hepatopâncreas, e as cadeias de carbonos utilizadas como substrato pela via gliconeogênica no hepatopâncreas.

Em *Litopenaeus vannamei* juvenil a aclimação ao meio hiposmótico aumentou a atividade da PEPCK hepatopancreática (Rosas et al., 2001).

Schein et al. (2004; 2005) demonstraram que os níveis de RNAm da PEPCK, a gliconeogênese e a atividade da PEPCK no músculo de *C. granulatus* aumentaram após submeter os animais ao estresse hiperosmótico ou hiposmótico. Os autores constataram que a atividade e os níveis de RNAm da PEPCK no inverno foram significativamente menores do que aqueles verificados no verão. Também no verão a atividade da PEPCK foi predominantemente mitocondrial, contudo, no inverno, os valores entre os compartimentos citosólico e mitocondrial foram semelhantes (Schein et al., 2005).

Em *C. granulatus* a gliconeogênese pode ser uma das vias envolvidas no mecanismo de adaptação deste caranguejos às alteração da osmolaridade do meio. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi de determinar a atividade das enzimas glicose-6-fosfatase (G6Fase) e frutose-1,6-bifosfatase (FBFase) no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias de *C. granulatus* submetidos a 3 dias de estresse hipo ou hiperosmótico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Animais**

Caranguejos *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea – Decapoda - Varunidae) machos, adultos no período de intermuda (Drach e Tchernigovtzeff, 1967), pesando 15 a 17 g, foram coletados, no verão, na Lagoa de Tramandaí, Rio Grande do Sul (coordenadas 29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste), Brasil, em marisma

tipicamente estuarino. Turcato (1990) verificou que no habitat deste caranguejo o teor de O<sub>2</sub> dissolvido na água varia entre 2,78 a 11,78 mgO<sub>2</sub>/L e a salinidade oscila de 0,22 a 34‰.

No laboratório, os animais foram mantidos em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural, aeração constante e alimentados, *ad libitum*, diariamente com carne bovina durante duas semanas antes dos procedimentos experimentais. Foram utilizados aproximadamente 30 animais neste estudo.

### **Procedimentos experimentais**

Após as duas semanas de aclimação, os caranguejos foram divididos em dois grupos experimentais e submetidos durante 3 dias ao estresse hiper ou hiposmótico.

Os animais submetidos ao estresse hiperosmótico foram colocados em um aquário com salinidade de 34‰ e os animais submetidos ao estresse hiposmótico foram colocados em aquário com água destilada (salinidade de 0‰). As salinidades foram determinadas através de um refratômetro (ATAGO S/MILL).

Durante os períodos de estresse, os animais foram mantidos em aquários nas mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, aeração e alimentação do período de aclimação, recebendo alimento até 16 horas antes de serem sacrificados.

Os animais mantidos nos aquários em condições de aclimação constituíram o grupo controle e estes caranguejos foram sacrificados juntamente com os animais dos demais grupos experimentais.

## **Atividade enzimática**

Para determinar a atividade das enzimas FBFase (EC 3.1.3.11) e G6Fase (EC 3.1.3.9), amostras das brânquias anteriores e posteriores, do hepatopâncreas e do músculo foram homogeneizadas em 3 volumes de sacarose 0,25M gelada. O homogenado foi centrifugado por 10 min. a 600xg e o sobrenadante resultante foi centrifugado por 15 min. a 12.000xg. Amostras do novo sobrenadante foram usadas para o ensaio enzimático segundo Battastini et al. (1991).

Para a determinação da atividade das enzimas, amostras foram incubadas em banho metabólico durante 10 minutos a 25°C nos seguintes sistemas:

- G6Fase: tampão maleato 0,1M, pH 6,8 e glicose-6-fosfato 0,02M (Camargo e Migliorini, 1971);
- FBFase: tampão glicilglicina 0,25M, pH 7-7,4 e frutose 1,6 bifosfato 0,025M (Camargo e Migliorini, 1971).

A reação foi interrompida com TCA 10%. O fosfato produzido na reação foi dosado pelo método de Chan e Swaminathan (1986). Os resultados foram expressos em nmol Pi. min.<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína.

## **Dosagem de proteína**

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

## Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão da média. Os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . Para a comparação entre vários grupos, foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Foi utilizado o programa SigmaStat para Windows.

## RESULTADOS

A atividade da G6Fase no grupo controle foi significativamente ( $P < 0,05$ ) mais elevada no hepatopâncreas quando comparada aquelas dos outros tecidos estudados. Nas brânquias anteriores a atividade da G6Fase foi cerca de 44% maior que nas brânquias posteriores nos animais do grupo controle (Tabela 1).

A tabela 1 mostra o efeito do estresse hipo e hiperosmótico sobre a atividade da G6Fase em tecidos de *C. granulatus*. O estresse hiposmótico causou um aumento ( $P < 0,05$ ) da atividade da enzima G6Fase somente no músculo. O estresse hiperosmótico causou um aumento ( $P < 0,05$ ) da atividade dessa enzima no hepatopâncreas, músculo e brânquias posteriores. Contrariamente, em brânquias anteriores o estresse hiperosmótico diminuiu 80% ( $P < 0,05$ ) a atividade da G6Fase.

No grupo controle a maior atividade da enzima FBFase foi verificada no hepatopâncreas ( $P < 0,05$ ). Não foi constatada diferença significativa na atividade da FBFase entre as brânquias anteriores e posteriores do grupo controle (Tabela 2).

A tabela 2 mostra o efeito do estresse hipo e hiperosmótico sobre a atividade da FBFase em tecidos de *C. granulatus*. Em brânquias anteriores e posteriores e no

músculo não ocorreram alterações significativas na atividade dessa enzima após o estresse hiposmótico. Em animais submetidos ao estresse hiperosmótico foi constatado um aumento de cerca de 2 vezes ( $P < 0,05$ ) na atividade da FBFase em brânquias posteriores. Entretanto, no hepatopâncreas a atividade dessa enzima diminuiu cerca de 51% ( $P < 0,05$ ) após o estresse hiperosmótico. Nas brânquias anteriores e no músculo não foram constatadas diferenças significativas da atividade da FBFase aos 3 dias de estresse hiperosmótico.

## **DISCUSSÃO**

As enzimas G6Fase e FBFase confirmam a presença da gliconeogênese em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo da mandíbula de *C. granulatus* e sua capacidade de liberação de glicose para a circulação. Em estudos anteriores a atividade e a expressão da PEPCCK foram demonstradas no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores de *C. granulata* (Oliveira e Da Silva, 1997; Chittó, 2000; Schein et al., 2004). A seqüência do cDNA da enzima PEPCCK (AY074922) do músculo mandibular também foi caracterizada neste caranguejo (Schein et al., 2004). Em outros crustáceos diversos trabalhos mostram que as atividades da G6Fase e da FBPase são muito baixas ou mesmo ausentes em hepatopâncreas, brânquias e músculo (Thabrew et al., 1971; Lallier e Walsh, 1991; Walsh e Henry, 1990; Henry et al., 1994; Hervant, 1996). Contrariamente, em *C. granulatus* as atividades da PEPCCK (Oliveira e Da Silva, 1997; Schein et al., 2004; Chittó 2000), da G6Fase e da FBFase são mais elevadas quando comparadas aquelas constatadas em outros crustáceos. Múltiplos fatores ligados à biologia e à ecologia

peculiares de cada espécie provavelmente contribuem para a diversidade encontrada entre os trabalhos sobre a atividade das enzimas gliconeogênicas em crustáceos. As diferenças entre os métodos bioquímicos utilizados pelos autores também corroboram para a variabilidade dos resultados. Em diferentes tecidos de *C. granulatus*, estudos demonstram a participação da via gliconeogênica no ajuste metabólico ao jejum e realimentação, a anoxia e recuperação e aos estresses hipo e hiperosmótico (Vinagre e Da Silva, 2002; Oliveira et al., 2004a e b; Schein et al., 2004; 2005), o que demonstra a importância desta via na manutenção da homeostase em diferentes situações fisiológicas neste caranguejo.

Em animais controle a maior atividade das enzimas G6Fase e FBFase foi verificada no hepatopâncreas, confirmando este órgão como um sítio metabólico importante para a produção de glicose em *C. granulatus*.

A aclimação ao meio hiposmótico reduziu em cerca de 50% ( $P > 0,05$ ) a atividade da G6Fase e não alterou a atividade da FBFase nas brânquias anteriores. Estes resultados concordam com os achados de Chittó (2000) que constatou uma redução na conversão da [ $^{14}\text{C}$ ]-L-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose em brânquias anteriores de *C. granulatus* submetido ao estresse hiposmótico.

A redução da atividade da G6Fase nas brânquias anteriores aos 3 dias de estresse hiperosmótico, reflete a redução da atividade gliconeogênica durante o processo de aclimação, que teria como objetivo aumentar a concentração de aminoácidos intracelulares, assim contribuindo com a regulação do volume celular (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997). Estes resultados concordam com os achados por Chittó (2000) que verificou, em *C. granulatus*, uma redução da conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-alanina em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose em brânquias anteriores de animais submetidos ao estresse hiperosmótico durante 6 dias.

Contrariamente as brânquias anteriores, as atividades da G6Fase e da FBFase nas brânquias posteriores aumentaram cerca de 2 vezes no estresse hiperosmótico. Este aumento da atividade enzimática coincidiu com a redução significativa da atividade gliconeogênica nesse tecido entre o período de 1-3 dias de estresse hiperosmótico e o retorno a valores semelhantes ao do grupo controle aos 6 dias de estresse osmótico encontrado neste mesmo caranguejo por Chittó (2005). Desta forma, neste estudo, o aumento da atividade enzimática, constatada aos 3 dias em meio hiperosmótico, refletiria o ajuste do volume celular à osmolaridade do meio durante o processo de aclimação.

A participação da via gliconeogênica no processo de aclimação ao estresse hiper e hiposmótico foi demonstrada no músculo mandibular de *C. granulatus* (Schein et al., 2004; Schein et al., 2005). Nesse tecido, 1 dia de estresse hiperosmótico, no verão, diminuiu em cerca de 50% a capacidade de conversão de [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose e a atividade da PEPCK mitocondrial, contudo aos 3 e 6 dias a capacidade gliconeogênica retorna a valores semelhantes ao do grupo controle (Schein et al., 2005). Nossos resultados confirmam o aumento da capacidade gliconeogênica após o 3º dia em meio hiperosmótico. Reforçando esta hipótese Schein et al. (2005) constataram um aumento da expressão do gene da PEPCK no músculo mandibular de *C. granulatus* no 1º dia de estresse hiperosmótico.

Neste estudo, o valor mais elevado de atividade da G6Fase constatado no músculo após 3 dias de estresse hiposmótico, concordam com os dados de Schein et al. (2005) que verificaram um aumento da conversão da [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-glicose e da atividade da PEPCK no músculo mandibular de *C. granulatus* após 1 dia em meio diluído.

No hepatopâncreas de *C. granulatus*, Oliveira e Da Silva (2000) constataram no 3º dia de estresse hiposmótico um aumento da conversão da [<sup>14</sup>C]-alanina em [<sup>14</sup>C]-

glicose que foi acompanhado pela elevação da atividade da PEPCK. Estes autores sugerem que os aminoácidos liberados dos diferentes tecidos durante o estresse hiposmótico seriam desaminados no hepatopâncreas, e as cadeias de carbonos utilizadas como substrato para a via gliconeogênica no hepatopâncreas. No hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* juvenil foi demonstrado que a aclimação à baixa salinidade aumentava a atividade da PEPCK (Rosas et al., 2001). Contudo, neste trabalho não foi constatada alteração significativa da atividade das enzimas G6Fase e FBFase no hepatopâncreas em animais submetidos ao estresse hiposmótico. Entretanto, Da Silva e Kucharski (1992) verificaram um aumento significativo da concentração de glicogênio hepatopâncreático em *C. granulatus* submetido ao estresse hiposmótico durante 6 dias, o que indicaria que a glicose formada pela gliconeogênese estaria sendo armazenada na forma de glicogênio neste tecido.

Em hepatócitos de ratos, Pederson et al. (1998) verificaram que a atividade da G6Fase aumenta com a elevação de aminoácidos intracelulares. Em fígado do peixe *Clarias batrachus*, Goswami et al. (2004) verificaram que a diminuição de volume celular induzido pelo estresse hiperosmótico causava um aumento da atividade da enzima G6Fase. Em *C. granulatus* submetido ao meio hiperosmótico a concentração de glicogênio hepatopancreático diminuiu marcadamente no 1º dia, porém os níveis de glicose livre aumentaram no 3º dia de estresse osmótico (Schein, 1999). Considerando, que a G6Fase participa tanto da gliconeogênese como da glicogenólise o aumento de sua atividade no hepatopâncreas no 3º dia de estresse hiperosmótico indicaria sua participação na glicogenólise neste tecido. Esta hipótese é reforçada pela redução significativa da atividade da FBFase hepatopancreática aos 3 dias de estresse hiperosmótico constatada neste estudo.

Segundo Lang e cols. (1998), mudanças do volume celular durante a aclimação ao estresse osmótico modificam várias funções metabólicas em células de mamíferos. O presente estudo demonstra o papel da modificação do volume celular sobre a atividade das enzimas da via gliconeogênica em diferentes tecidos de crustáceo, confirmando a participação desta via no ajuste metabólico durante a aclimação ao estresse osmótico em *C. granulatus*.

**Tabela 1**

Atividade da enzima glicose-6-fosfatase (G6Fase) (nmol Pi. min.<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína) em tecidos de caranguejos *C. granulata* submetidos a 3 dias de estresse hiposmótico ou hiperosmótico.

Tecidos	Controle	Estresse Hiposmótico	Estresse Hiperosmótico
Brânquias			
anteriores	4,44±3,08	2,33±1,72	0,89±0,59 *
Brânquias			
posteriores	2,49±1,09	1,69±0,9	5,01±1,1 *
Músculo	2,28±1,15	6,67±2,53*	8,63±4,67 *
Hepatopâncreas	16,56±6,83	22,08±7,83	30,62±5,19 *

Os valores são expressos como média ± desvio padrão de 4- 10 amostras

\* representa valores com diferença significativa em relação ao grupo controle

**Tabela 2**

Atividade da enzima frutose-1,6-bifosfatase (FBFase) (nmol Pi. min.<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteína) em tecidos de caranguejos *C. granulata* submetidos a 3 dias de estresse hiposmótico ou hiperosmótico.

Tecidos	Controle	Estresse Hiposmótico	Estresse Hiperosmótico
Brânquias			
Anteriores	5,26±2,52	5,99±3,10	6,06±2,14
Brânquias			
posteriores	5,98±2,66	7,77±2,59	10,41±2,62*
Músculo	13,21±3,81	15,4±3,8	9,68±5,03
Hepatopâncreas	35,08±9,8	33,1±10,1	17,05±4,15*

Os valores são expressos como média ± desvio padrão de 4-10 amostras

\* representa valores com diferença significativa em relação ao grupo controle

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Battastini A.M.O., Rocha, J.B.T., Barcellos, C.K., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1991) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochem. Res.**, 16 1303-1310.
- 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.** v.72, p.248-254.
- Bromberg, E (1992) **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão.** Rio Grande: FURG, 1992. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica)- Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Camargo, A C. M. e Migliorini, R.H. (1971) Gluconeogenesis in liver slices from pancreatectomized rats. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** 136: 962-966.
- Chittó (2000) **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Chittó, A.L.F. (2005) **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão.** Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Da Silva, R.S.M.; Kucharski, L.C.R., (1992) Effect of Hyposmotic Stress on the Carbohydrate Metabolism of Crabs Maintained on High Protein or Carbohydrate-Rich Diet. **Comp. Biochem. Physiol.** 101 A (3), 631-634.
- Drach, F. e Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu**, 161: 595-607.
- Gilles, R. (1997) “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 117A: 279-290.
- Gilles, R. e Delpire, E. (1997) Variations in salinity, osmolarity, and water availability: Vertebrates and invertebrates. **In:** Dantzeler, W.H. (ed). **Handbook of comparative physiology.** Oxford University Press, New York, Oxford, p. 1523-1586.
- Goswami, C; Datta, S; Biswas, K;Saha, N. (2004) Cell volume changes affect gluconeogenesis in the perfused liver of the catfish *Clarias batrachus*. **Journal of Biosciences:** 29 (3): 337-347.

- Habold C; Foltzer-Jourdainne C; Le Maho Y; Lignot, J; Oudart, H. (2005) Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. **Journal of Physiology-London**: 566 (2): 575-586.
- Henry, R.P.; Booth, C.E. Lallier, F.H.; Walsh, P.J. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 186: 215-234.
- Hervant F. Mathieu, J.; Garin, D. Frèminet, A. (1999) Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. **J. Exp. Biol.** 202: 579-592.
- Hervant, F. (1996) The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hypogean and epigean crustaceans. **C. R. Acad. Sci. Paris (Série III)** 319: 1071-1077.
- Hill, A. D.; Taylor, A. C.; Strang, R. H. C. (1991) Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 150:31-50.
- Johnston, M.A. e Davies, P.S. (1973) Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 41 B: 433-443.
- Lallier, F.H. e Walsh, P. (1991) Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bul. Marine Science**, 48(3): 665-669.
- Lallier, F.H. e Walsh, P. (1992) Metabolism of isolated hepatopancreas cells from the blue crab-crab (*Callinectes sapidus*) under stimulated postexercise and hypoxic conditions. **Physiol. Zool.** 65: 712-723.
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volki, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiol Ver.** 78: 247-306.
- Mane-Garzon, 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.
- Marks, D.B.; Marks, A.D.; Smith, C.M. (1996) **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Mithieux, G; Bady, I; Gautier, A; Croset, M; Rajas, F; Zitoun, C. (2004) Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes **Amer. J. Of Physiol.-Endoc.And Metab.** 286 (3): E370-E375.
- Moon, T.W. (1988). Adaptation, Constraint and function of gluconeogenesis pathway. **Can. Journal Zool.** 66: 1059-1068.
- Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C., Da Silva, R. S. M. (2004). Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus*

- granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **J. Exp. Zool.** 301A, 240-248.
- Oliveira, G. T.; Da Silva, R. S. M. (2000). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chamagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127 B, 375-381.
- Oliveira, G. T.; Rossi, I. C.; Kucharski, L. C. e Da Silva, R. S. M.(2004) Hepatopancreas gluconeogenesis during fasting in crabs previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.** A 137: 383-390.
- Oliveira, G.T. e Da Silva, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, 118 A (4): 1429-1435.
- Pederson, BA; Nordlie, MA; Foster, JD; Nordlie, RC. (1998) The effects of ionic strength and chloride ion on activities of the glucose-6-phosphatase system: regulation of the biosynthetic activity of glucose-6-phosphatase by chloride ion inhibition / deinhibition. **Arch. Biochem. Biophys.** 353 (1): 141-151.
- Rosas, C; Cuzon, G; Gaxiola, G; Le Priol, Y; Pascual, C; Rossignol, J; Contreras, F.; Sanchez, A; Van Wormhoudt, A. (2001) Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 259: 1-22.
- Schein, V. (1999) **Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1852.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 316: 203-212.
- Schein, V.; Waché, Y.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2004) Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters** 561: 202-206.
- Surholt, B. e Newsholme, E. (1981) Maximum activities and properties of glucose-6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.** 198: 621-629.
- Thabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, 40B: 531-541.
- Turcato, G.S. (1990) **Estudo bioecológica do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em

Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

Van Aardt, W. J. (1988) Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. **Comp. Biochem. Physiol.** 91A: 299-304.

Vinagre, A. S. e Da Silva, R. S. M. (2002) Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Can. J. Zool.** 80: 1413-1421.

Walsh, P.J. e Henry, R.P. (1990) Activities of metabolic enzymes in the deep-water crabs *Chaceon fenneri* and *C. quinquendens* and the shallow-water crab *Callinectes sapidus*. **Marine Biology.** 106: 342-346.

## CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

Este estudo evidenciou a presença da via gliconeogênica, utilizando-se [U<sup>14</sup>C]-glicerol como substrato, em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus*. A capacidade gliconeogênica foi maior no verão do que no inverno em ambos os tecidos. Entretanto, a síntese de [<sup>14</sup>C]-glicose a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol nas brânquias posteriores foi maior do que aquela das brânquias anteriores somente no verão.

A participação da via gliconeogênica no ajuste metabólico ao estresse hiperosmótico foi evidenciada em brânquias posteriores pela diminuição da conversão de [<sup>14</sup>C]-glicerol em [<sup>14</sup>C]-glicose no 3º dia de estresse no verão e, em ambas as brânquias, no 1º dia de estresse no inverno. De modo geral, durante o estresse hiposmótico, a via gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol em brânquias anteriores e posteriores não participa do ajuste metabólico ao estresse osmótico tanto em animais de inverno como naqueles de verão.

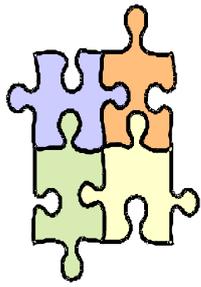
Também foi evidenciada a participação dos lipídios teciduais no ajuste metabólico ao estresse osmótico conforme a estação do ano. O aumento da concentração de lipídios totais nas brânquias e no hepatopâncreas sugere a participação da lipogênese no ajuste metabólico de aclimação ao estresse hiposmótico no inverno, abrindo uma nova perspectiva de investigação a ser desenvolvida no laboratório. No verão, a diminuição da concentração de lipídios totais durante o estresse hiperosmótico nas brânquias posteriores, no hepatopâncreas e no músculo sugere a utilização desse substrato no ajuste metabólico durante a aclimação ao estresse.

A atividade das enzimas gliconeogênicas G6Fase e FBFase confirmam que esta via é completa em brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas e no músculo

da mandíbula desse caranguejo. O efeito do estresse hipo ou hiperosmótico, *in vivo*, sobre a atividade das enzimas varia conforme o tecido do caranguejo.

Estudos sobre a atividade dessas enzimas em tecidos de *C. granulatus* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico *in vitro* seriam necessários para melhores esclarecimentos.

A investigação sobre a atividade das enzimas glicerol-quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase seria necessária para melhor avaliação da capacidade gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-glicerol nos tecidos estudados. Estudos, *in vitro*, utilizando-se aminoácidos como precursores ou com <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O para a determinação da capacidade lipogênica nas brânquias, bem como a medida de ácidos graxos livres e glicerol nos tecidos e na hemolinfa para a avaliação da lipólise irão esclarecer o papel do metabolismo de lipídios sobre a aclimação ao estresse hipo ou hiperosmótico no inverno e no verão.



**Gliconeo  
gênese**

		<b>Hiposmótico</b>		<b>Hiperosmótico</b>	
		<b>Inverno</b>	<b>Verão</b>	<b>Inverno</b>	<b>Verão</b>
<b>Gliconeo</b>	<b>BA</b>	=	=	↓	=
	<b>BP</b>	=	↓	↓	↓
<hr/>					
<b>Lipídios</b>		<b>Inverno</b>	<b>Verão</b>	<b>Inverno</b>	<b>Verão</b>
	<b>BA</b>	↑	=	=	=
	<b>BP</b>	↑	=	=	↓
	<b>Hepatop.</b>	↑	=	↑	↓
	<b>músculo</b>	=	=	=	↓
	<b>hemolinfa</b>	=	=	↓	=



**Lipogênese**

**Lipídios  
como  
substrato  
energético**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, C. E.; Tyler, P. A. e Varney M. S. (2000) Lipid profiles of *Nematocarcinus gracilis* a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. **Hydrobiologia**. 440 (1-3): 273-279.
- Baker, N.; Huebotter, R.J.; Schotz, M.C. (1965) Analysis of glucose-14C in tissues using thin-layer chromatography. **Analytical Biochemistry**, **10**:227-235.
- Battastini A.M.O., Rocha, J.B.T., Barcellos, C.K., Dias, R.D., Sarkis, J.J.F. (1991) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. **Neurochem. Res.**, **16** 1303-1310.
- Bishop, S.H.; Burton, R.S. (1993). Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, **106 A** (1): 49-56.
- Bock, C. (2005) **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.
- Bond-Buckup, G.; Fontoura, N.F.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C. (1991) **O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia**. Editora da Universidade - UFRGS, Porto Alegre, 71 p.
- Bowlos, R.D; Somero, G.N. (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure:rationales for the selection of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **J. Exp. Zool.** **208**: 137-152.
- 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.** **v.72**, p.248-254.
- Bromberg, E (1992) **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão**. Rio Grande: FURG, 1992. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica)- Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Camargo, A C. M. e Migliorini, R.H. (1971) Gluconeogenesis in liver slices from pancreatectomized rats. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** **136**: 962-966.
- Calado R.; Rosa, R.; Moraes, S. Nunes, M. L. Narciso, L. (2005) Growth, survival, lipid and fatty acid profile of juvenile mômaco shrimp *Lysmata seticaudata* fed on different diets. **Aquaculture Research** **36(5)**: 493-504.
- Cervino, C.O.; Luquet, C.M.; Haut, G.E.; Rodriguez, E.M. (1996) Preferências de salinidade do caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulata* (Dana 1851) após longo período de aclimação. **Atlântica**, **18**:69-75.
- Chan, L. P. E. e Swaminathan, R. (1986) Adenosine-triphosphate interferes with phosphate determination. **Clin. Chem.** **32**: (10) 1981.

- Chang, E.; O'Connors, J.D. (1983) Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss, D.E. (Ed.), **The Biology of Crustacea**. Academic Press, New York. pp 263-289.
- Charmantier – Dauers M., Charmantier G., Janssen K.P.C., Aiken D.E., Van Herp F. (1994). Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. **Gen Comp Endocr.** 94: 281-293.
- Chausson, F. e 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.
- Chittó, A.L.F. (2000) **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico**. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Chittó, A.L.F. (2005) **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Chung, J.S., Dirksen, H., Webster, S.G., (1999). A Remarkable, Precisely Timed Release Of Hyperglycemic Hormone From Endocrine Cells In The Gut Is Associated With Ecdysis In The Crab *Carcinus Maenas*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 96 (23), 13103-13107.
- Comoglio, L., Smolko, L. E Amin, O. (2005) Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopâncreas on adult males of the False Southern King crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol. B** 140 (3): 411-416.
- Corssmit, EPM; Romijn, JÁ; Sawerwein, HP (2001) Regulation of glucose production with special attention to non-classical regulatory mechanisms: a review. **Metab. Clin. Exp.** 50: 742-755.
- Cuesta, J. A., Diesel, R. e Schubart, C. D. (2001) Re-examination of zoeal morphology of *Chasmagnathus granulatus*, *Cyclograpsus lavauxi*, *Hemigrapsus sexdentatus*, and *H. crenulatus* confirms consistent chaetotaxy in the Varunidae (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, 74 (9): 895-912.
- Da Silva, R.S.M.; Kucharski, L.C.R., (1992) Effect of Hyposmotic Stress on the Carbohydrate Metabolism of Crabs Maintained on High Protein or Carbohydrate-Rich Diet. **Comp. Biochem. Physiol.** 101 A (3), 631-634.
- Devlin, T.M. (1997). **Textbook of biochemistry: with clinical correlations**. Wiley-Liss, New York, pp 299-313.
- Dias, G.S.(1996) **Estudo da gliconeogênese no manto e no hepatopâncreas do gastrópoda pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongus* (Müller, 1974)**. Porto

- Alegre: UFRGS, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Dias, G.S.(2000) **Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no gastrópoda pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongus***. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Drach, F. e Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu**, **161**: 595-607.
- Eckhardt, E.; Pierrot, C.; Thuet, P.; Van Herp, F.; Daures, C.M.; Trilles, J.P; Charmantier, G. (1995) Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Poligrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **99**:169-177.
- Folch, J.; Lees, M. e Stanley, H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** 226:497-503.
- Garcia, F.; Gonzalez-Baro, M.; Pollero, R. (2002) Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borelli*. **Lipids** 37 (6): 581-585.
- Genovese, G; Luchetti, C G; Luquet, C M. (2004) Na/K ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. **Marine Biology** 144: 111-118.
- Gilbert, L. I. e O'Connor, J. D. (1970) Lipid metabolism and transport in arthropods. In **Chemical Zoology** (Edited by Florkin M. and Scherr, B. T.) Part 5, Vol. 1 pp 229-254. Academic Press, New York.
- Gilles, R. (1982) Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, **6**:1-36.
- Gilles, R. (1987) Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. **Curr. Topics Membrane Transp.**, **30**: 205-247.
- Gilles, R. (1997) “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** **117A**: 279-290.
- Gilles, R. e Delpire, E. (1997) Variations in salinity, osmolarity, and water availability: Vertebrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed). **Handbook of comparative physiology**. Oxford University Press, New York, Oxford, p. 1523-1586.
- Goswami, C; Datta, S; Biswas, K;Saha, N. (2004) Cell volume changes affect gluconeogenesis in the perfused liver of the catfish *Clarias batrachus*. **Journal of Biosciences**: 29 (3): 337-347.
- Gourdoux, L. Lequellec, Y; Moreau, R.; Dutrien, J. (1983) Gluconeogenesis from some amino acids and its endocrine modification in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). **Comp. Biochem. Physiol.** **74B** (2): 273-276.
- Habold C; Foltzer-Jourdainne C; Le Maho Y; Lignot, J; Oudart, H. (2005) Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. **Journal of Physiology-London**: 566 (2): 575-586.

- Hanson, R. W. e Reshef, L. (2003) Glyceroneogenesis revisited. **Biochimie** 85: 1199-1205.
- Hanson, R. W. and Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene. **Annu. Rev. Biochem.** 66, 581-611.
- Harlocker, S.L.; Kapper, M.A.; Greenwalt, D.E.; Bishop, S.H. (1991) Phosphoenolpyruvate carboxikinase from ribbed mussel gill tissue: reactivity with metal ions, kinetics and action of 3-Mercaptopicolinic Acid. **J. Exp. Zool.** 257: 285-298.
- Hasek, B. E. e Felder, D. L. (2005) Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopâncreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. Reticulatum* (Crustacea, Decapoda) **Comp. Biochem. Physiol. B** 140(3): 455-463.
- Häussinger, D., Lang, F. and Gerok, W. 1994. Regulation of cell function by the cellular hydration state. **Am. J. Physiol.** 267, E343-E355.
- Herreid, C.F. e Full, R.J. (1988) Energetics and locomotion. In: Macmahon, B. (ed), **Biology of Land Crabs**. Cambridge University Press, Cambridge. p.337-377.
- Hervant, F. (1996) The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hypogean and epigean crustaceans. **C. R. Acad. Sci. Paris (Série III)** 319: 1071-1077.
- Hervant, F. e Renault, D. (2002) Long-term asting and realimentation in hypogean and epigean isopodos: a proposed adaptative strategy for groundwater organisms. **J. Exp. Biol.** 205 (14): 2079-2087.
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N.; Schneider, D. E.; Freed, J.M. (1970) The organization and control of metabolism in the crustacean gill. **Comp. Biochem. Physiol.**, 33: 529-548.
- Huggins, A.K e Munday, K.A. (1968) Crustacean metabolism. **Adv. Comp. Physiol. Biochem.**, 3: 271-376.
- Jahn, P.J. (2001) **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.
- Jeckel, W. H.; Demoreno, J. E. A.; Moreno, V. J. (1991) Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. **Comp. Biochem. Physiol.**, B 98: 253-260.
- Johnston, M.A. e Davies, P.S. (1973) Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 41 B: 433-443.
- Kasschau, M.R.; Skisak, C.M.; Cook, J.P. e Mills, W.R. (1984)  $\beta$ -Alanine metabolism and high salinity stress in the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*. **J. Comp. Physiol.**, 154 B: 181-186.
- Kinne, R.K.H. (1993) The role of organic osmolytes in osmoregulation - from bacteria to mammals. **J. Exp. Zool.** 265 (4): 346-355.
- Kraus-Friedmann, N.K. (1984) Hormonal regulation of gluconeogenesis. **Physiological Reviews**, 64(1): 170-255.

- Kucharski L.C., Ribeiro MF, Schein V, et al. (1997). Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **J. Exp. Biol.** 279 (2): 118-125
- Kucharski, L. C., Capp, E., Citto, A. L. F., (1999). Tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. **J. Exp. Zool.** 283 (1), 91-94.
- Kucharski, L.C., Schein, V., Capp, E., (2002). In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen Comp Endocr* 125 (2): 256-263.
- Kucharski, L.C.; Silva, R.S.M. (1992) Effects of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, **101**: 631-634.
- Kucharski, L.C.R. (1990) **Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia)-Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. (1991a) Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, **100 A** (3): 599-602.
- Kucharski, L.C.R. e Da Silva, R.S.M. (1991b) Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, **99A**: 215-218.
- Lallier, F.H. e Walsh, P. (1991) Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bul. Marine Science**, **48**(3): 665-669.
- Lang, F., Busch, G. L., Ritter, M., Volki, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Häussinger, D. (1998). Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiol Ver.** 78: 247-306.
- Lietz, T., Rybka, J. e Bryla, J. (1999) Fatty acids and glycerol or lactate are required to induce gluconeogenesis from alanine in isolated rabbit renal cortical tubules. **Amino Acids.** 16 (1) 41-58.
- Loret, S.M. e Devos, P.E. (1992) Structure and possible functions of the calcospherite-rich cells (R-cells) in the digestive gland of the shore crab *Carcinus maenas*. **Cell Tissue Res.**, **267**: 105-111.
- Loret, S.M.; Van Der Goor, N.; Devos, P.E. (1989) Suspensions d'hémocytes et d'hépatopancréatocytes pour l'étude *in vitro* de la charge en glucose chez un Crustacé Décapodé. **Océanis**, **15**(4): 419-431.
- Luquet, C. M. Rosa, G. A. Ferrari, C. C., enovese, G., Pellerano, G. N. (2000) Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. **Crustaceana** 73: 53-67.
- Luvizzotto-Santos R.; Lee, J. T.; Branco, Z. P. Bianchini, A. e Nery, L. E. M. (2003) Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea – Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295A: 200-205.

- Mane-Garzon, F.; Dei-Cas, E.; Spector, B.H. Leymonte, J. (1974) Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. In: Osmoregulation frente a cambios de la salinidad. **Physis, Seccion A,33(86):**163-171.
- Mantel, L.H.; Farmer, L.L. (1983). Osmotic and ionic regulation. In : Bliss, E.; Mantel, L.H. (ed), **The Biology of Crustacea**. v. 5, Academic Press, London. pp. 53-161.
- Marks, D.B.; Marks, A.D.; Smith, C.M. (1996) **Basic Medical Biochemistry: a clinical approach**. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Marqueze, A., (2004). **Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulata* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
- Martins, H. (2003). **Efeito da insulina sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATPase branquial, a síntese de proteínas e captação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Chasmagnathus granulata* (DANA, 1851)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul..
- Matsushima, o; Hayashi, Y.S. (1992). Metabolism of D e L-alanina and regulation of intracelular free amino acids levels during salinity stress in a bracksh-water bivalve *Corbicula japonica*. **Comp. Biochem. Physiol.** 102A; 465-471.
- Mithieux, G; Bady, I; Gautier, A; Croset, M; Rajas, F; Zitoun, C. (2004) Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes **Amer. J. Of Physiol.-Endoc.And Metab.** 286 (3): E370-E375.
- Moon, T.W. (1988). Adaptation, Constraint and function of gluconeogenesis pathway. **Can. Journal Zool.** 66: 1059-1068.
- Morris, S. e Airriess, C.N. (1998). Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. **S. Afr. J. Zool.** 33: 87-106.
- Munday, K.A. e Poat, P.C. (1971) Respiration and energy metabolism in Crustacea. **In:** Florkin, M. and Scheer, B. T. **Chemical Zoology**. New York: Academic Press. v. 6, p. 191-211.
- Mustafa, T.; Seub, J.; Jorgeusen, J.B.; Hoffmann, K.H. (1983) Gluconeogenesis in facultative anaerobic invertebrates: evidence of oxalacetate decarboxylation and anaerobic end product incorporation into glycogen from tissues of *Tubifex sp.* **Journal Comp. Physiol.** 149: 477-483.
- Nery, L.E.M; Santos, E.A.; Bianchini, A.; Gonçalves, A.A. (1993). Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 26:1291-1296.
- Newsholme, EA e Leech, AR (1983) **Biochemystry for the medical sciences**. John Wiley & Sons Ltda. 952p.
- Newsome, W.P.; Warskulat, U.; Noe, B.; Wettstein, M.; Stoll, B.; Gerok, W.; Haussinger, D. (1994) Modulation of phosphoenolpyruvate caboxykinase messenger RNA levels by the hepatocellular hydration state. **Biochem J.** 304:(2)555-560.

- Nicol, S.; Virtue, P.; King, R.; Davenport, S R.; McGaffin, A. F.; Nichos, P. (2004) Condition of *Euphausia crystallorophias* off East Antarctica in winter in comparison to other seasons. **Deep-sea Research part II**. 51(17-19): 2215-2224.
- Niwa, H.; Yamano, T.; e Sugano, T., Harris, RA (1986) Hormonal effects and the control of gluconeogenesis from sorbitol, xylitol and glycerol in perfused chicken liver. **Comp. Biochem. Physiol.** 85B(4): 739-745.
- Nordlie, R. C.; Foster, J. D. e Lange, A. J. (1999) Regulation of glucose production by the liver. **Annu. Ver. Nutr.** 19: 379-406.
- Odum, E.P. (1985) **Ecologia**. Interamericana (ed), Rio de Janeiro, 435 p.
- Okuma, E, Abe, H. 1994. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. **Comp. Biochem. Physiol.**, 109 A (1): 191-197.
- Oliveira, G. T.; Da Silva, R. S. M. (2000). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127 B, 375-381.
- Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C., Da Silva, R. S. M. (2004a). Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **J. Exp. Zool.** 301A, 240-248.
- Oliveira, G. T.; Rossi, I. C.; Kucharski, L. C. e Da Silva, R. S. M.(2004b) Hepatopancreas gluconeogenesis during fasting in crabs previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol. A** 137: 383-390.
- Oliveira, G.T. e Da Silva, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, 118 A (4): 1429-1435.
- Panserat S, Plagnes-Juan E, Breque J, Kaushik S. (2001) Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.** 204 (2): 359-365.
- Pequeux, A. (1995). Osmotic regulation in Crustaceans. **J. Crust. Biol.** 15(1): 1-60.
- Pierrot, C. S., Soye, D., Herp, F. V., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. and Charmantier, G., (2000). Involvement of Crustacean Hyperglycemin Hormone in the Control of Gill Ion Transport in the Crab *Pachygrapsus marmoratus*. **Gen. Comp. Endocrinology**, 119, 340-350.
- Pillet, S.C, Henry, R.P., Doeller, J.E e Krauss, D.W. (1995). A comparison of the gill physiology of two euryhaline 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.
- Rosa, R e Nunes, M L. (2003) Biochemical composition of deep-sea decapod crustaceans with two different benthic life strategies of the Portuguese, south coast. **Deep-sea Research part I**. 50 (1): 119-130.
- Rosa, R.; Calado, R.Andrade, AM; Narciso, L; Nunes, ML. (2005) Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol. B** 140 (2): 241-249.

- Rosas, C; Cuzon, G; Gaxiola, G; Le Priol, Y; Pascual, C; Rossignol, J; Contreras, F.; Sanchez, A; Van Wormhoudt, A. (2001) Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 259: 1-22.
- Santos, E.A e Nery, L.E.M. (1987) Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.**, **87A**(4):1033-1035.
- Sartori, D. R. S.; Garofalo, M. A. R.; Roselino, J. E. S.; Kettelhut, I. C.; Migliorini, R. H. (2000) Gluconeogenesis and P-enolpyruvate carboxykinase in liver and kidney of long-term fasted quails. **J. Comp. Physiol.** **170B**(5-6):373-377.
- Schein, V. (1999) **Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1852.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005a). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 316: 203-212.
- Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005b). 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.
- Schein, V.; Waché, Y.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2004) Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters** 561: 202-206.
- Schimit, A.S.C e Santos, E. (1993) Behaviour and haemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda) During emersion. **Comp. Biochem. Physiol.** **106A** (2): 337-342.
- Schliess, F. e Häussinger D.; (2002) The Cell hydration State: a critical determinant for cell death and survival. **Biol. Chem.** 267:E343-E355.
- Schmidt – Nielsen, K. (2002). **Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente.** 5<sup>a</sup> ed., Livraria Santos Editora.
- Schoffeniel, E. (1976). Adaptations with respect to salinity. **Biochem. Soc. Sympo.** **41**: 179-204.
- Serrano L, Blanvillain G, Soye, D. 2003. Putative Involvement Of Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms In The Neuroendocrine Mediation Of Osmoregulation In The Crayfish *Astacus Leptodactylus*. **Journal of Experimental Biology** 206 (6), 979-988.
- Sibert, V; Ouellet P; Brethes, JC. (2004) Changes in yolk total proteins and lipid components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. **Marine Biology.** 144 (6): 1075-1086.

- Sommogy, M. (1945). Determination of blood sugar. **Journal Biol. Chem.** **160**: 69-73.
- Soyez, D., Vanherp, F., Rossier, J., Lecaer, J.P., Tensen, C.P., Lafont, R. 1994. Evidence for a Conformational Polymorphism of Invertebrate Neurohormones - D-Amino-Acid Residue in Crustacean Hyperglycemic Peptides. **Journal Of Biological Chemistry** **269** (28),8295-18298.
- Storey, K.B. e Baley, E. (1978) Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of adult cockroack, *Periplaneta*. **Insect Biochem.** **8**:125-131.
- Thabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, **40B**: 531-541.
- Thompson, S. N. (1997) Gluconeogenesis in an insect, *Manduca Sexta* L., estimated from the <sup>13</sup>C isotopomer distribution in trehalose synthesized from [1,3-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>] glycerol. **Biochimica et Biophysica Acta.** **1336**: 110-116.
- Tielens, A. G. M.; Van der Meer, P.; Van den Heuvel, J. M.; Van den Bergh, S. G. (1991). The enigmatic presence of all gluconeogenic enzymes in *Schistosoma mansoni* adults. **Parasitology.** **102**: 267-276.
- Trapp, M., Kucharski, L. C., (2004). Atividade tirosina quinase do receptor à insulina e captação de 2-deoxi-glicose-<sup>14</sup>C em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* submetido ao estresse hiperosmótico. FeSBE – Federação de Sociedades de Biologia Experimental – 25 a 28 de agosto de 2004 – Águas de Lindóia – SP – Brasil.
- Trapp, M., Schein, V., Wache, Y, Favrel, P., Capp, E., Kucharski, L.C., Wormhoudt, A. van, Da Silva, R.S.M. 2002. Tyrosine kinase activity of the insulin receptor from *Chasmagnathus granulata* gills and partial cloning of insulin receptor gene. **European Comparative Endocrinologists.** August 26-36, 2002.
- Turcato, G.S. (1990) **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.
- Vinagre, A. S. e Da Silva, R. S. M. (2002) Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Can. J. Zool.** **80**: 1413-1421.
- Vinagre, A.S. (1999) **Metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: efeito do jejum e da realimentação e da apedunculção sobre a adaptação ao estresse hiposmótico.** Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Vinagre, A.S. and Da Silva, R.S.M. (1992). Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102** (3): 579-583.
- Walsh, P.J. e Henry, R.P. (1990) Activities of metabolic enzymes in the deep-water crabs *Chaceon fenneri* and *C. quinquendens* and the shallow-water crab *Callinectes sapidus*. **Marine Biology.** **106**: 342-346.

- Wiese, T.J.; Lambeth, D.O.; Ray, P.D. (1991) The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxikinase isoenzymes in various tissues of several mammals and birds. **Comp. Biochem. Physiol.** **100 B** (2): 297-302.
- Yancey P.H., Clark M.E., Hand H.C., Bowlus R.D., Somero G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science** 217: 1224-1222.
- Zammit, V.A. e Newsholme, E.A. (1978) Properties of piruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxikinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of the frog and marine invertebrates. **Biochem. J.** **174**: 979-987.