



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfisio e-mail: ppgfisio@vortex.ufrgs.br
Rua Sarmiento Leite, 500 - 2º andar
90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil
Fone/Fax: (051) 3316-3453



EFEITO DO HORMÔNIO HIPERGLICEMIANTE DE CRUSTÁCEOS SOBRE AS
RESERVAS DE CARBOIDRATOS EM *Chasmagnathus granulata* ALIMENTADOS COM
UMA DIETA RICA EM PROTEÍNAS OU EM CARBOIDRATOS

MERE LUCI DA ROSA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas, Área de concentração: Fisiologia, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas – Fisiologia.

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

EFEITO DO HORMÔNIO HIPERGLICEMIANTE DE CRUSTÁCEOS
SOBRE AS RESERVAS DE CARBOIDRATOS EM *Chasmagnathus*
***granulata* ALIMENTADOS COM UMA DIETA RICA EM PROTEÍNAS**
OU EM CARBOIDRATOS

Dissertação de Mestrado

MERE LUCI DA ROSA

Porto Alegre, 2005.

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS:

A todos os amigos, de todos os planos, que tornam a Vida mais alegre e mais interessante de ser vivida.

Aos meus pais, Naisi e Lauro, por terem me gerado e terem lutado contra todas as adversidades (e foram muitas) para que eu pudesse fazer aquilo de que sempre mais gostei: estudar.

Às minhas professoras do primário, em especial a professora Elisângela de Português e Shirley de Ciências por terem incentivado e apoiado meu gosto pela leitura e pelo aprendizado.

Às amigas Suzi e Lenise (as outras duas cajazeiras) pela amizade eterna, não importa a distância temporal ou geográfica, e a D. Lídia e S. Dionélio por terem sido minha família durante minha adolescência e pelos sábios conselhos a mim dispensados.

À D. Nilza que independentemente de laços familiares será sempre minha outra mãe.

Ao meu namorado, João Carlos, por todo o carinho e amor e que, por ser a pessoa única e maravilhosa que é, me fez acreditar novamente.

Ao Luiz, por ser o melhor orientador que alguém pode querer, pois tem a capacidade especial de saber ouvir, saber criticar construtivamente, e de promover a vontade do “querer saber mais” nos seus orientandos, os quais, sem exceção reconhecem a pessoa e o profissional maravilhoso que ele é.

À professora Dra. Roselis pelos ensinamentos e experiências trocadas que enaltecem a vida profissional e pessoal de todos aqueles que compartilham de sua companhia.

À Leticia “Maria” pelas risadas e companhia nas “indiadas”.

À Gabriela Dias pela ajuda na GF.

Ao Luciano pela parceria nos momentos difíceis da dosagem da GF e do Pi.

Ao Matheus pela ajuda na revisão.

A todos os professores e colegas, sejam de mestrado, doutorado, iniciação científica, estágio ou nenhuma das alternativas: Rogério, Zé Eduardo, Bira, Sandra, Ricardo, Ale, Marcinha, Aninha, Fabi, Dani, Lúcia, Lu, Alan, Gabi, Glauco, Alice e etc. que tornam o lab. 10 um segundo lar a todos os que ali se encontram.

Especialmente a minha colega e melhor amiga Carmen Bock que, dentre várias outras coisas, me mostrou que acasos não existem e que o bem mais precioso que podemos ter, é o amor de um amigo: existem ex-maridos, ex-namorados, ex-colegas, ex-professores, ex-alunos e etc, mas amigos, quando verdadeiros, jamais serão ex.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	4
RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS.....	9
RESUMO.....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	12
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS	
1. Coleta e manutenção dos animais.....	28
2. Procedimentos experimentais.....	29
2.1. Extração e administração do extrato de pedúnculos oculares.....	30
2.2. Procedimentos <i>in vivo</i>	
2.2.1. Isolamento e determinação do glicogênio.....	32
2.2.2. Determinação da concentração da glicose livre.....	32
2.2.3. Determinação da glicogênio-fosforilase.....	33
2.2.4. Determinação das proteínas.....	34
2.3. Procedimentos <i>in vitro</i>	
2.3.1. Captação de glicose.....	35
3. Tratamento estatístico.....	36
ARTIGO	
Efeito do Hormônio Hiperglicemiante de Crustáceos sobre as reservas de carboidratos do caranguejo <i>Chasmagnathus granulata</i> submetidos a uma dieta rica em proteínas ou carboidratos.....	38
Abstract.....	39

Key Words.....	40
1. Introdução.....	41
2. Material e Métodos	
2.1. Coleta e manutenção dos animais.....	44
2.2. Procedimentos experimentais.....	44
2.2.1. Extração e administração do extrato de pedúnculos oculares.....	44
2.2.2. Isolamento e determinação do glicogênio.....	45
2.2.3. Determinação da concentração da glicose livre.....	46
2.3. Tratamento estatístico.....	46
3. Resultados	
3.1. Efeito <i>in vivo</i> do extrato de pedúnculo sobre o metabolismo de carboidratos em <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com uma HP ou HC	
3.1.1. Concentração de glicose na hemolinfa.....	47
3.1.2. Concentração de glicose livre e glicogênio no hepatopâncreas.....	47
3.1.3. Concentração de glicose livre e glicogênio no músculo.....	48
4. Discussão e Conclusões.....	49
5. Agradecimentos.....	55
6. Referências Bibliográficas.....	62
RESULTADOS COMPLEMENTARES	
Efeito <i>in vivo</i> do extrato de pedúnculo sobre a atividade da glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e ativa (GFA) no hepatopâncreas de <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com uma dieta HC.....	65

Efeito <i>in vitro</i> do extrato de pedúnculo sobre a captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1- ¹⁴ C no hepatopâncreas de <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com uma dieta HC.....	71
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	77
ANEXO.....	88

RELAÇÃO DE FIGURAS E TABELAS

FIGURA 1: Seqüência de aminoácidos de CHHs de três espécies de crustáceos.....	16
TABELA 1: Composição das dietas HC e HP.....	29
FIGURA 1: Concentração de glicose na hemolinfa de <i>C. granulata</i> alimentados com uma dieta HP ou HC.....	57
FIGURA 2: Concentração de glicose livre no hepatopâncreas de <i>C. granulata</i> alimentados com uma dieta HP ou HC.....	58
FIGURA 3: Concentração de glicogênio no hepatopâncreas de <i>C. granulata</i> alimentados com uma dieta HP ou HC.....	59
FIGURA 4: Concentração de glicose livre no músculo de <i>C. granulata</i> alimentados com uma dieta HP ou HC.....	60
FIGURA 5: Concentração de glicogênio no músculo de <i>C. granulata</i> alimentados com uma dieta HP ou HC.....	61
FIGURA 6: Atividade da glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e ativa (GFA) no hepatopâncreas de <i>C. granulata</i> submetidos a uma dieta HC.....	70
FIGURA 7: Captação de glicose marcada no hepatopâncreas de <i>C. granulata</i> submetidos a uma dieta HC	73
TABELA 2: Níveis de carboidratos na hemolinfa, hepatopâncreas e músculo de <i>C. granulata</i> HP, HC, HP/HP, HP/HC, HC/HC, HC/HP.....	75

RESUMO

Estudos com o hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) tem sido realizados desde 1944 quando foi constatado, pela primeira vez, seu efeito na mobilização das reservas de glicogênio causando hiperglicemia.

O objetivo deste trabalho foi investigar a ação do CHH sobre o metabolismo de carboidratos de caranguejos *Chasmagnathus granulata* intactos submetidos às dietas rica em proteínas (HP) ou rica em carboidratos (HC) e injetados com extrato de pedúnculos proveniente de animais de ambas as dietas.

Após a injeção de extrato de pedúnculos, foram avaliados, *in vivo*: a glicose hemolinfática, a glicose livre hepatopancreática e muscular e o glicogênio hepatopancreático e muscular de animais alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos provenientes de animais HP (HP/HP), e de animais HC (HP/HC), bem como de animais alimentados com uma dieta HC, injetados com extrato de pedúnculos oriundos de animais HP (HC/HP) e de animais HC (HC/HC). Além de animais controle injetados com solução fisiológica para caranguejo (SFC).

Os resultados obtidos confirmam a ação hiperglicemiante dos extratos de pedúnculos, independentemente da dieta de origem dos mesmos. Foi observado um padrão de resposta diferencial segundo a dieta a qual os animais foram submetidos. Assim, os resultados demonstram que nos animais submetidos a uma dieta HP o CHH agiu aumentando os níveis de glicose circulante a partir das reservas de glicogênio dos hepatopancreócitos e do músculo. Mas, nos animais alimentados com uma dieta HC, embora o CHH tenha elevado o nível de glicose

circulante, não foram observadas alterações nas reservas de carboidratos do hepatopâncreas e do músculo.

Estes resultados demonstram que o mecanismo de ação do CHH sobre as reservas de carboidratos de *Chasmagnathus granulata* depende da dieta a qual os animais foram submetidos.

INTRODUÇÃO GERAL

A variabilidade de estudos sobre o metabolismo de crustáceos é tão grande quanto o número de espécies pesquisadas.

Esses animais possuem um elevado grau de interação com o meio em que vivem e seu metabolismo está diretamente relacionado a fatores externos e internos, tais como: disponibilidade de alimento, salinidade, temperatura e concentração de hormônios circulantes, reservas de substratos metabólicos, ativação ou inativação de vias metabólicas e assim por diante.

O caranguejo *Chasmagnathus granulata*, da família Grapsidae (Decapoda, Crustacea) é uma espécie estuarina típica que evoluiu de formas marinhas, habitando pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, passando pela costa Uruguaia, indo até o Golfo de São Martin, na Argentina (Boschi, 1964).

Os estuários são ecossistemas de transição entre o ambiente marinho e o límnic, que se caracterizam por períodos irregulares de total cobertura de água e outros de exposição completa do substrato, sofrendo, ainda, influência de fatores oceanográficos e meteorológicos, o que leva a um elevado grau de estresse ambiental a todos os seres vivos que neles habitam. O estresse pode ser gerado pelas variações extremas de fatores como a salinidade, a temperatura, a concentração de oxigênio dissolvido na água e os ciclos das marés (Botto e cols., 1980; Odum, 1985) e ainda, a disponibilidade e o tipo de alimentação (Busatto, 2002). Conforme Gilles (1997), os organismos lagunares e estuarinos são capazes

de tolerar as alterações físico-químicas deste ambiente, através de mudanças comportamentais, estruturais, funcionais e bioquímicas típicas destes animais.

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* é considerado um animal de hábito alimentar generalista, com estratégias alimentares detritívora e oportunista (D'Incao e cols., 1990). A análise de seu conteúdo estomacal revelou diferenças na quantidade e no tipo de alimento conforme a estação do ano, devido à disponibilidade destes no ambiente, assim, no outono e inverno há um predomínio de restos vegetais, na primavera, animais e no verão ocorre um equilíbrio desses dois itens alimentares.

O *C. granulata* é um ótimo modelo experimental para estudo do metabolismo e da endocrinologia comparados, pois além de ser um animal de fácil adaptação às condições de laboratório, tem seu nível glicêmico pouco afetado pelo manuseio ou troca de ambiente e se adapta com grande facilidade a diferentes tipos de dieta (Santos e Colares, 1986; Kucharski e da Silva, 1991b).

Os crustáceos se caracterizam por possuírem como locais de reserva de glicogênio o hepatopâncreas e o músculo (Herreid e Full, 1988; Kucharski e Da Silva, 1991b; Turcato, 1990; Vinagre e Da Silva 1992). O glicogênio armazenado é um substrato de fácil mobilização e disponibilidade rápida durante os diferentes processos fisiológicos de: muda, osmorregulação, crescimento e períodos de jejum (Kucharski e Da Silva 1991a; Turcato, 1990; Vinagre e Da Silva, 1992).

A glicose é o principal monossacarídeo na hemolinfa dos crustáceos (Morris e Airries, 1998). Nos crustáceos a glicose é utilizada para: síntese de mucopolissacarídeos, síntese de quitina, formação de piruvato e síntese de glicogênio (Hochachka, e cols., 1970; Herreid e Full, 1988).

Kucharski e Da Silva (1991a,b), trabalhando com *C. granulata*, verificaram que o padrão do metabolismo energético apresenta mudanças marcantes em função do conteúdo de carboidratos ou proteínas contidos na dieta administrada. Nos animais alimentados com a dieta rica em carboidratos (HC), a concentração de glicose na hemolinfa e o conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo aumentam significativamente em relação àqueles do grupo mantido com a dieta protéica (HP). Estes autores, ao investigarem o efeito da variação sazonal sobre o metabolismo energético desse crustáceo, verificaram que o glicogênio estocado pelo hepatopâncreas e pelo músculo seria consumido como substrato energético durante os meses de primavera e verão. Já no outono e no inverno, os lípidios musculares seriam o substrato energético preferencial.

O efeito de dietas também tem sido avaliado em outros crustáceos. Rosas e cols., (2000), analisando o efeito da composição da dieta no camarão azul *Litopenaeus stylirostris*, observaram que a dieta rica em carboidratos influenciou a cinética dos níveis de glicose na hemolinfa, diminuindo o tempo para obtenção do pico glicêmico, de 3 horas, para os animais com dieta pobre em carboidratos, para 1 hora nos alimentados com uma dieta rica em carboidratos. Foi verificado, ainda, a presença e o aumento na atividade de enzimas como a α -amilase e a α -glicosidase em *Litopenaeus stylirostris* (Rosas e cols., 2000) e a hexoquinase em *Litopenaeus vannamei* (Gaxiola e cols., 2005) em animais submetidos à dieta rica em carboidratos.

Estudos sobre o efeito das dietas em outros invertebrados também têm sido realizados. O caracol *Lymnaea stagnalis* apresentou aumento dos níveis

glicêmicos e da concentração tecidual de glicogênio após a administração de dieta rica em carboidratos (Veldhuijzen, 1975; Veldhuijzen e Van Beek, 1976). No gastrópoda pulmonado *Megalobulimus oblongus* foi verificado que a dieta rica em carboidratos aumenta os níveis de glicose na hemolinfa e de glicogênio no hepatopâncreas, diafragma e manto (Rossi, 1992). Este autor sugere que nestes moluscos a síntese de glicogênio tecidual seria regulada pela concentração de glicose na hemolinfa.

Há, também, estudos sobre a endocrinologia de crustáceos relacionada ao metabolismo. Já foram descritos vários tecidos com função endócrina: órgão Y, glândula androgênica, ovários, órgão pericárdico, órgão pós-comissural, sistema órgão X-glândula do seio (Brown, 1946; Knowles, 1953; Alexandrowicz, 1952; Le Roux, 1968, Fingerman, 1997).

O órgão X foi assim denominado, logo após sua identificação, devido a sua função ser desconhecida na época (Brown, 1946; Welsh, 1941). Embora, seu funcionamento tenha sido esclarecido por Passano (1951) e Bliss (1951), este nome persiste até hoje. O sistema órgão X-glândula do seio, localizado nos pedúnculos oculares da maioria dos crustáceos decápodos (Fingerman, 1992), tem um funcionamento análogo ao sistema hipotálamo-neurohipófise, dos vertebrados. Assim, o órgão X produz hormônios que são transportados, via axônios até a glândula do seio que os armazena, temporariamente, até que algum estímulo periférico, provoque a liberação dos mesmos (Beltz, 1966; Fingerman, 1997).

Abramowitz e cols. (1944) descreveram, pela primeira vez, a existência de um “Fator Diabetogênico” em crustáceos. Em 1989, Kegel e cols. elucidaram a

estrutura química do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH). Os CHHs , até agora seqüenciados, são peptídeos com 72-74 resíduos de aminoácidos (Fig. 1), incluindo 6 resíduos cisteína, formando 3 pontes dissulfeto e peso molecular variando entre 6-9 KDa (Keller, 1992; Kummer e Keller, 1993; Sefiani e cols., 1996; Smullen e cols., 1996; Soyez, 1997).

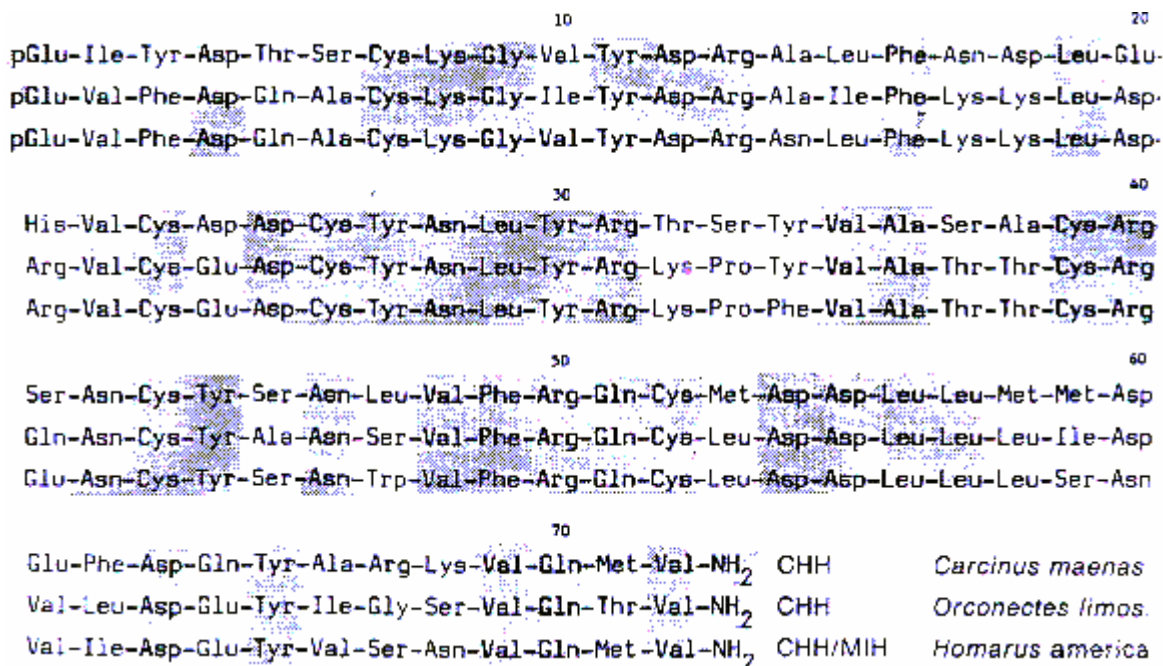


Fig.1: Seqüência de aminoácidos de CHHs de três espécies de decápodes: Seqüência superior: *Carcinus maenas*; seqüência intermediária: *Orconectes limosus*; seqüência inferior: *Homarus americanus*. (Keller,1992)

Estudos sobre a dinâmica da biossíntese deste hormônio demonstram que a duração do período que o pré-pró-CHH leva para se transformar em CHH, desde o órgão X, até ser estocado na glândula do seio é de 8-14 hs (Ollivaux e Soiez, 2000) e seu mecanismo de ação intracelular, parece ser mediado por segundo mensageiro, possivelmente GMPc, AMPc e/ou Ca^{+2} (Sedlemeier, 1987; Keller e Sedlmeier, 1988, Keller e cols., 1994).

Segundo Kallen e cols. (1990), 40% das terminações axonais que chegam a glândula do seio, são preenchidos por grânulos secretórios de CHH. O hormônio hiperglicemiante de crustáceos é um hormônio pleiotrópico que desenvolve um papel central no processo metabólico, especialmente na regulação dos níveis de glicemia e exibe uma ação secretagoga sobre as enzimas digestivas (Keller e Sedlmeier, 1988; Ollivaux e Soiez, 2000). Além de seu papel na regulação dos níveis de glicose sanguínea, há estudos que demonstram seu envolvimento na produção de ecdisteróides (Yasuda e cols., 1994), no metabolismo de lipídios (Santos e cols., 1997), na fisiologia ovariana (Khayat, 1998), e na osmorregulação (Charmantier-Daures, 1994; Serrano, 2003).

Keller, em 1992, trabalhando com três espécies diferentes de crustáceos, demonstrou que o CHH tem grande homologia, em sua seqüência de aminoácidos, com outros dois hormônios, também sintetizados nos pedúnculos oculares: o hormônio inibidor da muda (MIH) e o hormônio inibidor da vitelogênese (VIH), também chamado de hormônio inibidor das gônadas (GIH) e classificou todos esses hormônios, como integrantes de uma mesma família de peptídeos. Soyez (1997) demonstrou que outro hormônio, o hormônio inibidor do órgão mandibular (MO-IH), produzido no órgão mandibular, também tem sua seqüência muito parecida com o CHH, o MIH e o VIH. A homologia de seqüências entre esses hormônios é tamanha que o MIH tem uma atividade hiperglicemiante semelhante ao CHH (Chang e cols., 1998), e o CHH tem atividade inibidora da muda tal qual o MIH (Webster, 1986; Toullec e Dauphin-Villemant, 1994).

Estudos demonstram que os CHHs, geralmente, são polimórficos. Keller (1992) e Soyez (1997) identificaram quatro isoformas de CHH na lagosta

Homarus americanus, três isoformas no lagostim *Procambarus clarkii* e cinco isoformas no camarão *Procambarus japonicus*. No entanto, a análise da seqüência de aminoácidos revelou poucas diferenças entre as isoformas.

Kummer e Keller, em 1993, após demonstrarem a existência de receptores, com alta afinidade para o CHH, em membranas de hepatopâncreas de *Carcinus maenas* e *Orconectes limosus* verificaram que o CHH de *C. maenas* ligava-se aos receptores de *O. limosus*, embora com baixa afinidade, e vice-versa. Esses autores sugeriram a partir dessas observações que hormônio e receptores podem ter evoluído conjuntamente.

Os CHHs de *C. maenas* e *O. limosus* possuem 61% de homologia, segundo Kummer e Keller (1993). Nery e cols. (1993) compararam os efeitos dos CHHs de *C. maenas* e *O. limosus* com o extrato de pedúnculo ocular de *C. granulata* e verificaram que os hormônios de ambas as espécies foram capazes de causar hiperglicemia em *C. granulata* apresentando, porém, diferentes efeitos sobre os níveis de glicogênio e glicose muscular e hemolinfática. O CHH de *C. maenas* causou diminuição dos níveis de glicogênio muscular e hemolinfático e da glicose livre muscular, enquanto o CHH de *O. limosus* elevou significativamente os níveis de glicogênio muscular e não alterou os níveis de glicogênio hemolinfático. Segundo os autores, existiriam diferentes tipos de receptores em cada tecido o que levaria a ativação de diferentes rotas bioquímicas produzindo, no final, o mesmo efeito biológico.

Santos e Keller (1993c) demonstraram que após 5 minutos de administração de extrato de pedúnculo ocular, já ocorre hiperglicemia na maioria dos crustáceos, prolongando-se esse efeito até duas horas após a injeção do

extrato. Santos e Colares (1986) estudando o caranguejo *Chasmagnathus granulata* verificaram um aumento progressivo da concentração de glicose hemolinfática, até 60 minutos após a injeção de extrato de pedúnculo, após esse tempo, os níveis começaram a cair lentamente.

Vários estudos apontam a ação do CHH sobre diferentes tecidos, como: hemócitos (Johnston e Davies, 1972; Santos e Stefanello, 1991), hepatopâncreas (Sedlemeier, 1987; Kummer e Keller, 1992), músculo e tegumento (Keller e Andrew, 1973; Santos e cols., 1988), gônadas e brânquias (Morris e Airries, 1998). Ainda Kummer e Keller (1993) e Webster (1993) identificaram receptores específicos para o CHH no coração, órgão Y e epiderme de *C. maenas* e *O. limosus*.

Johnston e cols. (1973), através de estudos citológicos em *C. maenas* caracterizaram os hemócitos, como células circulantes na hemolinfa com alto teor de glicogênio e verificaram a presença de glicose-6-fosfatase. Johnston e cols. (1972) comparando os carboidratos das células do hepatopâncreas e dos hemócitos demonstraram que o conteúdo de polissacarídeos, em especial de glicogênio, é 4 vezes maior nos hemócitos que nos hepatopancreócitos. Santos e Stefanello (1991) verificaram um aumento na liberação de glicose na hemolinfa de *C. granulata* incubada com extrato de pedúnculos oculares o que indicaria, segundo os autores “a função dos hemócitos como hepatócitos circulantes”. Loret (1993) identificou no caranguejo *Carcinus maenas* a presença da enzima hexoquinase nos hemócitos desse animal.

Sedlemeier (1987), estudando o lagostim *O. limosus* identificou o hepatopâncreas como tecido alvo do CHH. Kummer e Keller (1992) identificaram

um grande número de receptores com alta afinidade para o CHH nas membranas dos hepatopancreócitos de *O. limosus* e *C. maenas*.

Estudos sobre a origem da glicose mobilizada pelo CHH são muito divergentes e, dificilmente, chega-se a um consenso de qual é o mecanismo de ação e os tecidos alvo deste hormônio.

Alguns trabalhos sugerem que a hiperglicemia causada pelo CHH deva-se mais pela diminuição da utilização e/ou captação de glicose pelos tecidos do que pelo aumento da degradação de glicogênio, entretanto, esses experimentos não foram conclusivos em relação a estas afirmações (Santos e cols., 1988; Santos e Stefanello, 1991; Scheer e Scheer, 1951).

Sedlmeier e Keller, em 1981, com estudos *in vitro*, demonstraram aumento nos níveis de nucleotídeos cíclicos, após a injeção de CHH, no músculo e no hepatopâncreas e uma diminuição dos níveis de glicogênio e da incorporação de glicose marcada em glicogênio no hepatopâncreas, sugerindo que o CHH liberaria glicose a partir do glicogênio hepatopancreático e muscular. No entanto, Keller e Andrew, em 1973 e Telford, em 1975, não verificaram qualquer alteração no conteúdo de glicogênio do hepatopâncreas após aplicação do hormônio, mas somente uma pequena queda de glicogênio no músculo. Santos e Keller, em 1993, verificaram que a injeção de glicose causou uma diminuição dos níveis de CHH circulantes, enquanto que o lactato provocou um aumento nos níveis desse hormônio, levando esses autores a sugerirem que a glicólise estimularia a liberação de CHH que, por sua vez, estimularia a glicogenólise. Quanto aos níveis de glicogênio, enquanto alguns trabalhos indicam aumento da concentração no hepatopâncreas (Parvathy, 1972) e músculo

(Schwabe e cols., 1952), outros demonstram redução da concentração nas gônadas, músculo e brânquias (Keller e Andrew, 1973).

No processo de conversão de glicose em glicogênio e de degradação de glicogênio em glicose, duas enzimas chave estão envolvidas: a glicogênio-sintase (GS) e a glicogênio-fosforilase (GF), que catalisam a conversão de glicose-1-fosfato (G-1-P), em glicogênio e vice-versa, respectivamente. No fígado de vertebrados, o glucagon e o AMP exercem efeito estimulatório sobre a atividade da GF, enquanto ATP e glicose exercem um efeito inibitório (Lehninger, 2000). Tendo em vista que o CHH de crustáceos tem a mesma resposta metabólica sobre os níveis de glicose circulante que o glucagon de vertebrados, este também atuaria estimulando a GF.

Sedlmeier, em 1982, através de estudos *in vivo* no lagostim *O. limosus*, verificou que a atividade da glicogênio-sintase (GS) aumentava após ablação bilateral dos pedúnculos, sendo esse efeito revertido, após injeção de CHH. No entanto, esse autor verificou que, embora os níveis de atividade da GS voltassem ao normal, uma considerável quantidade de glicogênio continuava a ser sintetizada, mesmo em presença de CHH. Esses resultados, aliados à diminuição da taxa de incorporação de glicose em glicogênio, em até 50% no hepatopâncreas do mesmo animal, *in vitro*, levaram esse autor a concluir que a concentração de glicose no meio influenciaria a síntese de glicogênio, agindo sobre a glicogênio-fosforilase (GF) (Sedlmeier, 1987). Este autor, comparou a concentração de glicose usada em seu experimento que foi de 10 mM com o valor usado por Santiago e cols.(1974) que foi de 4 mM, tendo estes últimos verificado

uma inibição da GF no músculo. Assim, quanto maior a concentração de glicose, menor a taxa de interconversão de fosforilase *a* para fosforilase *b*.

A inibição da síntese de glicogênio, mediante altas concentrações de glicose, também foi verificada por Hemminga e cols. (1985 a, b), ao estudar o manto e células de armazenamento de glicogênio do caracol *Lymnae sp*, sob incubação com fator hiperglicemiante de moluscos. Keller (1965) e Ramamurthi (1968) demonstraram uma diminuição na atividade da GF muscular, logo após a ablação dos pedúnculos, sendo esse efeito revertido, logo após a injeção de CHH. No entanto, Ramamurthi (1968) verificou uma diminuição da atividade enzimática total em *Hemigrapsus nudus*, enquanto Keller (1965), em *O. limosus*, não observou nenhuma alteração. Bauchau (1968) verificou um aumento da atividade da GFA depois da incubação do tecido muscular, com extrato de pedúnculo.

Oliveira (1998) comparando a atividade da glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e na forma ativa (GFA), sobre o metabolismo de carboidratos do hepatopâncreas de *C. granulata* expostos a diferentes tempos de anoxia e recuperação da anoxia, não observou diferença significativa na atividade da GFT nos animais alimentados com dieta HC e HP. No entanto, a atividade da GFA comparada a GFT dos animais HC foi de 98%, enquanto que nos animais HP foi de 66%. Este autor sugere que a concentração de glicogênio intracelular controle sua mobilização, via interconversão da forma *b* para a forma *a* da glicogênio-fosforilase, através de um sistema de retroalimentação entre os níveis de glicogênio tecidual e o sistema fosforilase. Oliveira (2001) verificou que durante as primeiras quatro horas de exposição a anoxia, houve um aumento na GFT e na GFA, de animais alimentados com dietas HP e HC, que levou a uma diminuição

nos níveis de glicogênio hepatopancreático de ambas as dietas, ao contrário do observado no bivalve *Geukensia demissus* em que a proporção da GFT e GFA não foi alterada perante anoxia (Russel e Storey, 1995).

Várias situações de estresse que influenciariam direta ou indiretamente a liberação do CHH foram estudadas: estresse osmótico (Vinagre, 1999); anoxia e hipóxia (Santos e Colares, 1986), choque térmico (Kuo e Yang, 1999); metais pesados (Nagabhushanam e Kulkarni, 1981; Machele e cols., 1989; Reddy e Bhagyalakshmi, 1994; Lorezon e cols., 2004), infecção por parasitas (Lorezon e cols., 1997, 2004; Stentiford e cols., 2001); ritmo circadiano (Kallen e cols., 1990).

Estudos, *in vitro*, realizados no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada da UFRGS (LaMEC), revelam que a administração de extrato de pedúnculos ao meio de incubação, em animais com dieta HC, causou aumento dos níveis de glicose no meio com hepatopâncreas, tanto nos animais apedunculados, como nos animais intactos. Enquanto que àqueles alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos com a mesma concentração que os primeiros, não apresentaram hiperglicemia, levando a hipótese, de que a administração prévia com a dieta HP, levaria a um aumento na resistência periférica ao CHH. Isto porque, provavelmente, nessa dieta haveria menores níveis circulantes de glicose, enquanto que na dieta HC ocorreria o oposto (Vinagre, 1999). Este autor verificou, ainda, que a resposta metabólica à ação do hormônio é dependente tanto da dose de hormônio, como da quantidade de glicose circulante. Com base nos dados obtidos em seus experimentos, ele sugere que, nos animais alimentados com uma dieta HC, a liberação de CHH

estaria inibida devida à alta concentração de glicose na hemolinfa o que levaria a um maior acúmulo de hormônio nos pedúnculos.

O efeito do estresse osmótico em *C. granulata* sobre os padrões de resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico após administração de extrato de pedúnculos em caranguejos intactos e apedunculados não produziu diferenças entre as dietas HC e HP (Vinagre, 1999). Este autor observou que, apesar da ablação bilateral dos pedúnculos oculares, os animais foram capazes de aumentar a concentração de glicose na hemolinfa (atingindo valores semelhantes aos dos caranguejos íntegros) e de mobilizar as reservas de glicogênio. Esse autor sugere que outros hormônios, além do CHH, estariam envolvidos no controle dos níveis circulantes de glicose e/ou a existência de alguma outra fonte de CHH fora do sistema órgão X-glândula do seio.

Santos e Keller (1993a) estudando *C. maenas*, e Vinagre (1999) com *C. granulata*, observaram que os níveis de CHH hemolinfático diminuem conforme o aumento da concentração de glicose hemolinfática, corroborando com a hipótese de que a concentração de glicose na hemolinfa controla a secreção de CHH. Em *O. limosus* os níveis circulantes de glicose diminuem, enquanto que os de CHH aumentam, após seis dias de jejum, conforme observado por Keller e Orth (1990).

Glowik e cols. (1997), estudando as células neuronais do sistema órgão X-glândula do seio do caranguejo *Cancer borealis* demonstraram que as mesmas são sensíveis a D-glicose, portanto, apresentam alguma semelhança àquelas encontradas: no núcleo hipotalâmico lateral, na substância nigra, no hipotálamo ventro-medial e hipocampo, de vertebrados (Karadi e cols., 1992; Saller e Chiodo, 1980; Watts e cols., 1995; Mizuno e Oomura, 1984; Edwards e Weston, 1993;

Tromba e cols., 1994). Nessas células a D-glicose ativa uma corrente de K⁺, induzindo uma hiperpolarização, que inibe a secreção dos grânulos de CHH. Portanto, a glicose exerceria um *feedback* negativo sobre a liberação de CHH.

Em 1999, Vinagre, ao estudar o efeito da administração do meio de incubação de pedúnculos oculares sobre a glicemia de caranguejos intactos ou apedunculados, observou que nos caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta HC a administração do meio resultante da incubação de 4 pedúnculos oculares em SFC, provocou hiperglicemia, tanto em animais intactos, como em apedunculados. Nos animais HC apedunculados, os níveis de glicose circulante, 120 minutos após a administração do meio, triplicaram em relação aos do grupo de animais intactos. O autor sugere que a retirada prévia do CHH através da ablação bilateral tenha aumentado o número e/ou afinidade dos receptores ao hormônio, sendo um tipo de modulação semelhante ao que ocorre com a insulina em vertebrados.

No entanto, praticamente todos os animais estudados foram submetidos a uma dieta de proteínas, com exceção do trabalho de Vinagre (1999) e Oliveira (1998, 2001), não existe até agora nenhum trabalho publicado em torno da influência da dieta sobre a ação do CHH. Assim como, não existem publicações que demonstrem a ação dos CHHs de animais submetidos a diferentes dietas sobre a ação da GF.

Ainda, existem hipóteses sobre a ação do CHH na inibição da captação de glicose pelos tecidos, no entanto, nenhum trabalho publicado relata um experimento para comprovar esta ação.

A revisão da literatura demonstra que existem algumas perguntas a serem respondidas para elucidar um pouco mais a ação metabólica desse hormônio a tanto tempo descoberto, assim como as rotas metabólicas e os mecanismos sobre a ação pelo qual efetua sua atividade hiperglicemiante.

O presente trabalho visa obter algumas respostas ou, talvez, criar mais perguntas sobre esses aspectos inerentes ao estudo da ação desse hormônio.

OBJETIVOS

A partir da revisão da literatura verificou-se a importância de investigar a ação do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) sobre o metabolismo de carboidratos de caranguejos *Chasmagnathus granulata*, submetidos às dietas rica em proteínas (HP) ou rica em carboidratos (HC).

Para atingir este objetivo, foram avaliados:

- O efeito do CHH proveniente de animais alimentados com dieta HP ou HC sobre as concentrações da glicose hemolinfática;
- O efeito do CHH proveniente de animais alimentados com dieta HP ou HC sobre as concentrações de glicose livre no hepatopâncreas e no músculo;
- O efeito do CHH proveniente de animais alimentados com dieta HP ou HC sobre as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo;

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e manutenção dos animais

Os animais utilizados para realização deste trabalho foram caranguejos *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (CRUSTACEA; DECAPODA; GRAPSIDAE), machos, adultos e no período intermuda (Drach & Tchernigovtzeff, 1967).

Os caranguejos foram coletados na margem leste da Lagoa de Tramandaí, no Rio Grande do Sul (29°58' lat. Sul e 58°08' long. Oeste), em um marisma parcialmente coberto pela vegetação halo-hidrófila, cortado por arroios que drenam a água de origem pluvial da planície costeira. O clima da região é subtropical-úmido com temperatura anual média de 17,6 °C e precipitação pluviométrica inferior a 1300 mm anuais (Moreno, 1961).

As coletas foram feitas entre os meses de junho e julho de 2003 e 2004. Os animais foram capturados manualmente no sedimento areno-lodoso, submersos na água ou entocados, sendo então, transportados em caixas plásticas com água do próprio local até o laboratório.

Transcorridas 24 horas, os caranguejos foram colocados em um tanque com água a 20‰, pois, segundo Mañe-Garzon e cols. (1974) esta salinidade é semelhante ao ponto isosmótico do *Chasmagnathus granulata*, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural, aeração constante e alimentação *ad libitum*, uma vez

por semana com carne bovina crua, aí permanecendo por duas semanas para aclimação antes de serem submetidos aos experimentos.

2. Procedimentos experimentais

Depois de transcorridas as duas semanas de aclimação, os caranguejos foram divididos em dois grupos experimentais, sendo separados em dois aquários, com salinidade igual a 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante. Os animais foram denominados HC e HP, sendo alimentados com arroz cozido e carne bovina crua, respectivamente (tabela 1). O alimento foi administrado *ad libitum*, no período vespertino, durante duas semanas.

TABELA 1. Composição das dietas rica em carboidratos (HC) e rica em proteínas (HP) administradas *ad libitum*, ao caranguejo *Chasmagnathus granulata*. Os valores de cada item estão expressos em percentuais e o valor calórico total está expresso em cal/100g.

	Dieta Rica em Carboidratos (arroz branco cozido)	Dieta Rica em Proteínas (carne bovina crua)
Carboidratos	34,56	0,03
Proteínas	3,34	21,59
Gorduras	0,45	6,71
Fibras	0,30	0,31
Cinzas	0,02	0,35
Umidade	61,33	71,01
Valor calórico total	155,65	146,87

2.1- Extração e administração do extrato de pedúnculos oculares

No início da manhã do dia escolhido para extração dos tecidos para posterior análise dos mesmos, foi separado um grupo de animais (5 animais HC e 5 HP) os quais sofreram ablação dos pedúnculos oculares, de onde foi extraído o extrato de pedúnculo contendo CHH.

Após os animais terem sido colocados no gelo por 5 minutos, tiveram os pedúnculos removidos com uma tesoura cirúrgica de ponta curva e fina. Em seguida, os pedúnculos sofreram um corte paralelo ao seu eixo maior, na região mediana. Após, foram macerados em um cadinho, com 2,0 mL de solução fisiológica de caranguejo (SFC) gelada a 1 °C, e osmolaridade de 770 mOsm. A SFC utilizada é constituída de NaCl 350 mM; KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 25 mM, H₃BO₃ 8,8 mM; pH: 7,8. Estas SFCs foram adaptadas ao *C. granulata* a partir daquela descrita por Lorêt e cols. (1989). A osmolaridade da SFC foi medida por criocristalização em osmômetro automático Knauer.

Depois de macerados, os pedúnculos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 5000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi injetado nos animais (100 µL/animal), na concentração de 0,5 mEq de pedúnculo/animal (Nery e cols., 1993), conforme segue:

- I) Animais intactos alimentados com dieta HC foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HC: Grupo HC/HC.
- II) Animais intactos alimentados com dieta HC foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HP: Grupo HC/HP.
- III) Animais intactos alimentados com dieta HP foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HP: Grupo HP/HP.

IV) Animais intactos alimentados com dieta HP foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HC: Grupo HP/HC.

Ainda, foram utilizados animais intactos de cada dieta, injetados com SFC, para servir como grupos controle: grupo HP, grupo HC. Sendo I, II, III, IV denominados grupos experimentais.

Em todos os grupos experimentais foram utilizados de 3 a 5 animais.

O extrato de pedúnculos e a solução fisiológica para caranguejos foram injetados entre o terceiro e o quarto pereiópodo esquerdo de cada animal.

Após 45 minutos da administração do extrato de pedúnculo, os animais foram crionestesiados para remoção da hemolinfa, tecido hepatopancreático e músculo das quelas.

Foi utilizado o tempo de 45 minutos após a injeção do hormônio para retirada dos tecidos, pois segundo dados da literatura o tempo que o hormônio leva para agir, em várias espécies de crustáceos, varia de 5 a 120 minutos (Santos e Keller, 1993a). Estudos demonstraram que o tempo de ação do CHH no caranguejo *Chasmagnathus granulata* varia de 20 a 60 minutos, diminuindo seu efeito gradativamente, após esse tempo (Santos e Colares, 1986; Vinagre, 1999, Oliveira, 2001).

2.2- Procedimentos *in vivo*

2.2.1- Isolamento e determinação do glicogênio

O isolamento do glicogênio do hepatopâncreas e do músculo da queela seguiu o método descrito por Van Handel (1965), e determinado como glicose após a hidrólise ácida, como descrito por Geary e cols. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color). A leitura foi realizada na absorvância de 505 nm em espectrofotômetro marca Varian, modelo Cary.

A concentração de glicogênio em ambos os tecidos foi expressa em mg/g de tecido úmido.

2.2.2- Determinação da concentração da glicose livre

Os níveis de glicose na hemolinfa, e de glicose livre no hepatopâncreas e músculo foram determinados conforme método descrito por Carr e Neff (1984). As amostras dos tecidos foram pesadas, homogeneizadas com um macerador de tecidos (marca ULTRA TURRAX) em uma solução de citrato de sódio 100mM, fervidas por 10 minutos, agitadas e resfriadas à temperatura ambiente. As amostras foram mantidas a -20°C por no máximo 72 horas até a dosagem. Com o objetivo de eliminar a interferência dos lipídios, foi acrescentada às amostras, uma mistura de clorofórmio-metanol, na proporção de 2:1 (w/v) e centrifugadas por 10 minutos a 2800 rpm. A concentração de glicose livre foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color), na fração superior obtida com a centrifugação. A leitura foi realizada a absorvância de 505 nm em espectrofotômetro marca Varian, modelo Cary.

Os resultados foram expressos em mg de glicose livre por g de peso úmido de tecido.

2.2.3- Determinação da glicogênio-fosforilase (GF)

Os hepatopâncreas de 3 a 5 animais, de cada grupo (HC cont; HP cont.; HC/HC; HP/HP; HP/HC; HC/HP) foram retirados pós-crionestesia e imediatamente submetidos a congelamento em gelo seco, para evitar qualquer atividade enzimática. Logo após esse rápido congelamento, os tecidos foram pesados e homogeneizados em uma solução de 500 mM de NaF (Fluoreto de Sódio), 50mM de EDTA, 12 μ L de PMSF e glicerol (60%), pH 6,5, na proporção 1:3 (w/v). Após essa homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 800 x g, a temperatura de 4 °C, por 10 minutos.

O sobrenadante foi, então, diluído em uma solução contendo 500 mM de NaF, 50mM de EDTA, e água milli-Q (pH 6,5) na proporção de 1:1 (w:v).

O ensaio da enzima GF foi realizado na direção da síntese de glicogênio pela quantificação de Pi liberado da glicose-1-fosfato, conforme método descrito por Scapin e Di Giuseppe (1994). A mistura de ensaio (meio de reação) para a GFT (Glicogênio Fosforilase Total) continha 2% de glicogênio, 100mM de NaF, 5 mM de EDTA, 20 mM de citrato de sódio, 2 mM de AMP e 1 M de sulfato de sódio e para GFA (Glicogênio Fosforilase Ativa), no lugar do AMP e do sulfato de sódio, foram acrescentados 1 mM de cafeína e Água milli-Q, até completar o volume. O pH de ambos os meios de reação foi de 6,5.

Tubos contendo 50 μL de amostra, mais 100 μL de meio de reação para GFT ou GFA foram colocados em banho metabólico a 25 ° C por 5 minutos. Decorrido este tempo, a reação enzimática era iniciada pela adição de 50 μL de glicose-1-fosfato (50 mM) em intervalos de 30 segundos entre cada tubo. O tempo total de reação foi de 30 minutos, a 25 ° C sob agitação constante, a reação era interrompida pela adição de 200 μL de TCA gelado a 10%, sendo imediatamente congelados até a dosagem do Pi. A atividade enzimática foi determinada em duplicata para cada uma das amostras.

O Pi liberado da reação foi determinado pelo método de Chan e cols. (1986). Todo o material utilizado no ensaio enzimático e na determinação do Pi foi prévia e adequadamente lavado para evitar contaminação com fosfatos. A atividade da enzima foi expressa em nmoles de Pi liberados da glicose-1-fosfato, por mg de proteínas, por minuto.

2.2.4- Determinação das proteínas

As proteínas totais foram quantificadas segundo Bradford (1976). Para a realização das dosagens foram utilizados os seguintes reagentes:

- Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma): 25 mg em 12,5 mL de etanol 95%;
- Ácido Ortofosfórico 85% (Merck): 25 mL

Para a preparação da solução de Bradford foram misturados os dois reagentes nas proporções citadas acima e o volume foi completado com água milli-Q para 250 mL. Esta solução foi conservada gelada e ao abrigo da luz.

Para a quantificação, usou-se 1 mL de Solução de Bradford, mais 20 μ L de amostra de tecido.

A leitura foi realizada a absorvância de 595 nm em espectrofotômetro marca Varian, modelo Cary.

Os resultados foram expressos em mg/mL.

2.3- Procedimentos *in vitro*

2.3.1- Captação de glicose

Foram preparados tubos tipo eppendorf com 400 μ L de SFC mais 0,15 μ Ci de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C (Amersham International/ 55 mCi/ mmol). A esse meio de incubação foi adicionado 100 μ L de extrato de pedúnculos. Após terem sido pesados, foram adicionadas porções de hepatopâncreas (aproximadamente 150 mg). Após a adição do tecido, os tubos eram novamente pesados para a determinação do peso do tecido utilizado. Foi então, realizada a substituição da fase gasosa por uma mistura de O₂: CO₂ (95:5 v/v) e incubação dos tecidos em banho metabólico do tipo Dubnoff, sob agitação constante a 25 °C, por 45 minutos. Este tempo foi escolhido pelo fato de ser o tempo de ação do extrato de pedúnculo nos animais do experimento *in vivo*.

Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, os tecidos retirados, lavados em solução fisiológica para caranguejos gelada, secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 1mL de água milli-Q. Após, os tecidos foram congelados e fervidos por

três vezes consecutivas para que ocorresse a ruptura das células e a liberação da 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C captada pelo tecido (T). Os tubos que continham o meio de incubação (M), foram congelados até o processamento das amostras. Amostras de 100 µL do T e do M foram dissolvidas em frascos contendo 5 mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%). A radioatividade foi quantificada em parêlo LKB-Wallac com 95% de eficiência. Os resultados foram expressos pela relação da radioatividade contida no tecido e no meio (T/M: dpm/mL do tecido, por dpm/mL do meio), conforme método descrito por Machado e cols. (1991).

3. Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como média (\pm) o desvio padrão da média (DP). Para comparação dos dados experimentais obtidos nas curvas de tratamento, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Para comparação do efeito da dieta sobre o tratamento hormonal, foi usado ANOVA de duas vias, também com teste de comparação SNK. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05 ($p < 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

ARTIGO

Este artigo que será apresentado faz parte desta dissertação de mestrado. Está formatado para a futura versão para o inglês com adaptações para publicação em periódico "**Comparative Biochemistry and Physiology**". (Vide anexo, pg. 88)

Efeito do hormônio hiperglicemiante de crustáceos sobre as reservas de carboidratos do caranguejo *Chasmagnathus granulata* submetidos a uma dieta rica em proteínas ou em carboidratos

Autores: Mere Luci da Rosa & Luiz Carlos Rios Kucharski

Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento de Fisiologia/ Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/ UFRGS

Mere Luci da Rosa

R. Sarmiento Leite, 500- Campus Centro

Porto Alegre-RS/Brasil

Fone: (51) 3316-3505

Fax: (51) 3316-3166

e-mail: merelrosa@gmail.com

ABSTRACT

Studies with the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) have been carried out since 1944, when its effect on glycogen mobilization resulting in hyperglycemia was established for the first time.

The objective of this work was to investigate CHH action on the carbohydrate metabolism of intact estuarine crabs *Chasmagnathus granulata* submitted to high protein (HP) or high carbohydrate (HC) diet, which were injected with eyestalk extract from animals of both diets.

After eyestalk extract injection, we assessed *in vivo* the hemolymphatic glucose, the hepatopancreatic and muscular free glucose and the hepatopancreatic and muscular glycogen from animals fed on HP diet, injected with eyestalk extract from HP animals (HP/HP), and from HC animals (HP/HC), as well as animals fed on a HC diet injected with eyestalk extract from HP animals (HC/HP) and from HC animals (HC/HC). Control animals were injected with Crab Physiological Solution (CPS).

The results confirm the hyperglycemic action of eyestalk extracts regardless the previous diet. However, a different response pattern was observed according to the diet to which the animals were previously submitted. Thus, the results show that in animals submitted to HP diet, CHH increased the circulating glucose levels from the glycogen storage in hepatopancreas and muscle. On the other hand, in animals fed on a HC diet, although the CHH increased the circulating glucose level no alterations on carbohydrate storage in the hepatopancreas and muscle were observed.

These results show that the effect of CHH on hepatopancreas and muscle of *Chasmagnathus granulata* depends on the diet to which the animal was previously submitted.

Key Words: crab, CHH, diet, carbohydrate, protein.

1. Introdução

Abramowitz e cols. (1944) descreveram, pela primeira vez, a existência de um “fator diabetogênico” em crustáceos. Mais tarde, em 1989, Kegel e cols. elucidaram a estrutura química do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH).

Estudos sobre a dinâmica da biossíntese deste hormônio demonstram que a duração do período que o pré-pró-CHH leva para se transformar em CHH, desde o órgão X, até ser estocado na glândula do seio é de 8-14 hs (Ollivaux e Soiez, 2000) e seu mecanismo de ação intracelular, parece ser mediado por segundo mensageiro, possivelmente GMPc, AMPc e/ou Ca^{+2} (Sedlemeier, 1987; Keller e Sedlmeier, 1988).

Segundo Kallen e cols. (1990), 40% das terminações axonais que chegam a glândula do seio, são preenchidos por grânulos secretórios de CHH. O hormônio hiperglicemiante de crustáceos é um hormônio pleiotrópico que desenvolve um papel central no processo metabólico, especialmente na regulação dos níveis de glicemia e exibe uma ação secretagoga sobre as enzimas digestivas (Keller e Sedlmeier, 1988; Ollivaux e Soiez, 2000).

Santos e Keller (1993c) demonstraram que após 5 minutos de administração de extrato de pedúnculo ocular, já ocorre hiperglicemia na maioria dos crustáceos, prolongando-se esse efeito até duas horas após a injeção do extrato. Santos e Colares (1986) estudando o caranguejo *Chasmagnathus granulata* verificaram um aumento progressivo da concentração de glicose

hemolinfática, até 60 minutos após a injeção de extrato de pedúnculo, após esse tempo, os níveis começaram a cair lentamente.

Vários estudos apontam a ação do CHH sobre diferentes tecidos, como: hemócitos (Johnston e Davies, 1972; Santos e Stefanello, 1991), hepatopâncreas (Sedlemeier, 1987; Kummer e Keller, 1992), músculo e tegumento (Keller e Andrew, 1973; Santos e cols., 1988), gônadas e brânquias (Morris e Airries, 1998). Ainda Kummer e Keller (1993) e Webster (1993) identificaram receptores específicos para o CHH no coração, órgão Y e epiderme de *C. maenas* e *O. limosus*.

Johnston e cols. (1973), através de estudos citológicos em *C. maenas* caracterizaram os hemócitos, como células circulantes na hemolinfa com alto teor de glicogênio e verificaram a presença de glicose-6-fosfatase nessas células. Johnston e cols. (1972) comparando os carboidratos das células do hepatopâncreas e dos hemócitos demonstraram que o conteúdo de polissacarídeos, em especial de glicogênio, é 4 vezes maior nos hemócitos que nos hepatopancreócitos.

Sedlemeier (1987), estudando o lagostim *O. limosus* identificou o hepatopâncreas como tecido alvo do CHH. Kummer e Keller (1992) identificaram um grande número de receptores com alta afinidade para o CHH nas membranas dos hepatopancreócitos de *O. limosus* e *C. maenas*.

Santos e Keller (1993a) estudando *C. maenas*, e Vinagre (1999) com *C. granulata*, observaram que os níveis de CHH hemolinfático diminuem conforme o aumento da concentração de glicose hemolinfática, corroborando com a hipótese de que a concentração de glicose na hemolinfa controla a secreção de CHH.

Glowik e cols. (1997), estudando as células neuronais do sistema órgão X-glândula do seio do caranguejo *Cancer borealis* demonstraram que as mesmas são sensíveis a D-glicose.

Estudos, *in vitro*, realizados no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada da UFRGS (LaMEC), revelam que a administração de extrato de pedúnculos ao meio de incubação, em animais com dieta HC, causou aumento dos níveis de glicose no meio com hepatopâncreas, tanto nos animais apedunculados, como nos animais intactos; enquanto que aqueles alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos com a mesma concentração que os primeiros, não apresentaram hiperglicemia, levando à hipótese, de que a administração prévia com a dieta HP, levaria a um aumento na resistência periférica ao CHH. Isto porque, provavelmente, nessa dieta haveria menores níveis circulantes de glicose, enquanto que na dieta HC ocorreria o oposto (Vinagre, 1999). Este autor verificou, ainda, que a resposta metabólica à ação do hormônio é dependente tanto da dose de hormônio, como da quantidade de glicose circulante. Com base nos dados obtidos em seus experimentos, ele sugere que, nos animais alimentados com uma dieta HC, a liberação de CHH estaria inibida devida à alta concentração de glicose na hemolinfa o que levaria a um maior acúmulo de hormônio nos pedúnculos.

Esse trabalho tem como objetivo investigar a ação do CHH sobre o metabolismo de carboidratos de caranguejos *Chasmagnathus granulata* submetidos às dietas rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC).

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e Manutenção dos Animais

Os animais utilizados foram caranguejos *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (CRUSTACEA; DECAPODA; GRAPSIDAE), machos, adultos e no período intermuda (Drach & Tchernigovtzeff, 1967) coletados de um estuário 'as margens da Lagoa de Tramandaí-RS/Brasil.

As coletas foram feitas entre os meses de junho e julho de 2003 e 2004. Os animais foram capturados manualmente e transportados em caixas plásticas com água do próprio local até o laboratório.

2.2. Procedimentos Experimentais

Os animais foram alimentados com carne bovina crua (HP) e arroz cozido (HC). O alimento foi administrado *ad libitum*, diariamente, no período vespertino, durante duas semanas. Os aquários foram mantidos com salinidade igual a 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante.

2.2.1. Extração e Administração do Extrato de Pedúnculos Oculares

Após os animais terem sido crioanestesiados, os pedúnculos de 5 animais HC e 5 HP foram removidos. Foram macerados com 2,0 mL de solução fisiológica de caranguejo (SFC) gelada a 4°C, e osmolaridade de 770 mOsm. Depois de macerados, os pedúnculos foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 5000 x g, por 5 minutos. O sobrenadante foi injetado nos animais

(100 μ L/animal), na concentração de 0,5 mEq de pedúnculo/animal, conforme segue:

- I) Animais intactos alimentados com dieta HC foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HC: Grupo HC/HC.
- II) Animais intactos alimentados com dieta HC foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HP: Grupo HC/HP.
- III) Animais intactos alimentados com dieta HP foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HP: Grupo HP/HP.
- IV) Animais intactos alimentados com dieta HP foram injetados com extrato de pedúnculo de animais HC: Grupo HP/HC.

Ainda, foram utilizados animais intactos de cada dieta, injetados com SFC como grupos controle: grupo HP, grupo HC. Sendo I, II, III e IV denominados grupos experimentais.

Em todos os grupos experimentais e controles foram utilizados de 3 a 5 animais.

O extrato de pedúnculos e a SFC foram injetados entre o terceiro e o quarto pereiópodo esquerdo de cada animal.

Após 45 minutos da administração do extrato de pedúnculo, os animais foram crionestesiados para remoção da hemolinfa, tecido hepatopancreático e músculo das quelas.

2.2.2. Isolamento e Determinação do Glicogênio

O isolamento do glicogênio do hepatopâncreas e do músculo da quelas seguiu o método descrito por Van Handel (1965), e determinado como glicose

após a hidrólise ácida, como descrito por Geary e cols. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color). A concentração de glicogênio em ambos os tecidos foi expressa em mg/g de tecido úmido.

2.2.3. Determinação da Concentração da Glicose Livre

Os níveis de glicose na hemolinfa, e de glicose livre no hepatopâncreas e músculo foram determinados conforme método descrito por Carr e Neff (1984).

A concentração de glicose livre foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color), na fração superior obtida com a centrifugação. Os resultados foram expressos em mg de glicose livre por g de peso úmido de tecido.

2.3- Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos como média (\pm) o desvio padrão da média (DP). Para comparação dos dados experimentais obtidos nas curvas de tratamento, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). Para comparação do efeito da dieta sobre o tratamento hormonal, foi usado ANOVA de duas vias, também com teste de comparação SNK. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05 ($p \leq 0,05$).

As análises estatísticas foram realizadas com programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

3. Resultados

3.1. Efeito *in vivo* do extrato de pedúnculo sobre o metabolismo de carboidratos em *C. granulata* alimentados com uma dieta HP ou HC

3.1.1. Concentração de Glicose na Hemolinfa

Nos animais submetidos a uma dieta HP, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da glicemia em relação ao grupo controle, tanto no grupo que recebeu injeção de extrato de pedúnculo de animais HP (HP/HP), como no que recebeu injeção de pedúnculo de animais HC (HP/HC). Não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais (Fig. 1 A).

O mesmo foi observado nos animais com dieta HC, ou seja, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da glicemia em relação ao grupo controle, tanto no grupo que recebeu injeção de extrato de pedúnculo de animais HP (HC/HP), como no que recebeu injeção de pedúnculo de animais HC (HC/HC). Não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais (Fig. 1 B).

3.1.2. Concentração de Glicose Livre e de Glicogênio no Hepatopâncreas

Nos animais submetidos a uma dieta HP, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) na glicose livre em relação ao grupo controle, tanto no grupo que recebeu injeção de extrato de pedúnculo de animais HP (HP/HP), como no que recebeu injeção de pedúnculo de animais HC (HP/HC). Não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais (Fig. 2 A).

Nos animais submetidos a uma dieta HC, embora tenha ocorrido uma pequena diminuição nos níveis de glicose livre dos grupos experimentais em

relação ao controle, a mesma não é significativa. Não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais (Fig. 2 B).

Quanto ao glicogênio, nos animais HP, somente o grupo HP/HC apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Fig. 3 A).

Nos animais submetidos a uma dieta HC, não foram observadas diferenças significativas, nem dos grupos em relação ao controle, nem entre os grupos experimentais (Fig. 3 B).

3.1.3. Concentração de Glicose Livre e de Glicogênio no Músculo

Nos animais submetidos a uma dieta HP, observou-se um aumento significativo na glicose livre ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, tanto no grupo que recebeu injeção de extrato de pedúnculo de animais HP (HP/HP), como no que recebeu injeção de pedúnculo de animais HC (HP/HC). Foi constatada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do grupo HP/HC em relação ao HP/HP (Fig. 4 A).

Nos animais submetidos a uma dieta HC, não foram observadas diferenças significativas, nem dos grupos em relação ao controle, nem entre os grupos experimentais (Fig. 4 B).

Através de análise estatística (ANOVA TWO WAY) observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de glicose livre quando se compara as duas dietas havendo uma interação entre as dietas e os grupos demonstrando que a dieta altera os níveis de glicose livre em função do CHH injetado (Fig. 4 A e B).

Quanto ao glicogênio, nos animais HP, não foram observadas diferenças significativas, nem dos grupos em relação ao controle, nem entre os grupos experimentais (Fig. 5 A).

Nos animais submetidos a uma dieta HC, não houve diferença significativa do grupo controle em relação ao grupo que recebeu extrato de pedúnculo HP (HC/HP), no entanto, observa-se uma diminuição no glicogênio ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle no grupo que recebeu injeção de extrato de pedúnculo de animais HC (HC/HC). Foi constatado um aumento significativo ($p < 0,05$) do grupo HC/HP em relação ao HC/HC (Fig. 5 B).

4. Discussão e Conclusões

O efeito hiperglicêmico da injeção de extrato de pedúnculos oculares foi constatado nos caranguejos *C. granulata* alimentados com uma dieta HP, assim como, na dieta HC.

Observou-se que os extratos de pedúnculos oriundos de animais HP e HC têm o mesmo efeito sobre a glicemia tanto em animais alimentados com uma dieta HP, como em uma dieta HC, muito embora, os níveis de hiperglicemia sejam significativamente maiores nos animais HC quando comparados aos HP. No entanto, ao compararmos as duas dietas podemos constatar que os níveis basais de glicose hemolinfática são significativamente maiores nos animais HC. Esses dados foram similares aos encontrados por Kucharski e Da Silva (1991a) que, investigando o efeito da composição da dieta sobre a regulação das reservas de

carboidratos no caranguejo *C. granulata*, verificaram um aumento significativo dos valores de glicose na hemolinfa e nas reservas de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo de animais alimentados com uma dieta HC quando comparados àqueles com dieta HP.

Vinagre (1999) estudando o efeito da ablação bilateral dos pedúnculos oculares de *C. granulata* sobre o metabolismo de carboidratos até 144 horas de adaptação ao estresse hiposmótico, verificou que 48 horas após a ablação dos pedúnculos, os valores da glicemia diminuíram 30% nos caranguejos HP, e 60% nos HC. Santos e Colares (1986) avaliando o efeito da ablação dos pedúnculos em *C. granulata*, alimentados com dieta HP, não verificaram qualquer alteração nos níveis de glicose hemolinfática até 96 horas após a cirurgia. Entretanto, Santos e cols. (1988) estudando o mesmo animal, com a mesma dieta, verificaram uma diminuição de 60% dos níveis de glicose hemolinfática 24 horas após a ablação bilateral. Segundo os autores, a utilização de técnicas distintas de determinação de glicose foi o motivo da obtenção de resultados tão diferentes.

Vinagre (1999) observou que nos animais alimentados com uma dieta HP, a administração do meio resultante da incubação de 4 pedúnculos oculares não alterou significativamente os valores de glicose hemolinfática, sendo necessário aumentar o número de pedúnculos no meio de incubação para 8 ou 12 para ser observado o mesmo efeito hiperglicemiante apresentado pelos animais HC. Com análise baseada nesses resultados Vinagre (1999) sugere que a administração prévia de uma dieta HP levaria a um aumento na resistência periférica a ação do CHH. Com isso, a síntese e a liberação do hormônio estaria aumentada nos pedúnculos de animais HP, o que explicaria a necessidade de

incubar um maior número de pedúnculos oculares para a obtenção de uma hiperglicemia. Assim, pedúnculos oriundos de animais HC, teriam muito mais CHH do que àqueles originados de animais alimentados com dieta HP.

Trabalho de Sedlemeier (1987) com o lagostim *O. limosus* identificou o hepatopâncreas como tecido alvo do CHH. Os dados da literatura demonstram que esse tecido atuaria como um sítio de liberação de glicose durante situações desfavoráveis, como a restrição alimentar, a anoxia e o estresse hiposmótico. Ainda, estudos demonstram que o tecido hepatopancreático do caranguejo *C. granulata* apresenta uma elevada concentração de glicogênio (Kucharski e Da Sliva, 1991b; Nery e cols., 1993; Vinagre e Da Silva, 1992; Oliveira, 1998).

Podemos verificar no presente trabalho, que o aumento dos níveis de glicose livre do hepatopâncreas causado pelo extrato de pedúnculos oriundos de animais HP ou de animais HC foi constatado somente nos animais alimentados com uma dieta HP. Ao analisarmos os valores de glicogênio neste tecido, observou-se uma diminuição tanto no grupo que recebeu injeção de extrato de pedúnculos oriundo de animais HP, como de HC, embora esta diminuição seja significativa somente nos animais injetados com extrato de pedúnculos HC reforçando a hipótese de que nestes pedúnculos há uma maior quantidade e/ou atividade do CHH, levando-nos a considerar que, em animais alimentados com uma dieta HP, o aumento na glicose livre hepatopancreática pode ser originado da glicogenólise neste tecido provocada pelo CHH.

Quanto ao tecido muscular, no presente estudo, podemos verificar que os níveis basais de glicogênio muscular dos animais HC são 3,5 vezes maiores que os HP e os de glicose livre não apresentam diferenças significativas entre as

dietas, confirmando os resultados encontrados por Vinagre e Da Silva (1992), que verificaram que os níveis de glicogênio muscular de animais alimentados com dieta HC foram 65% maiores que aqueles encontrados nos animais HP, e por Schein (1999) que não observou diferenças significativas da glicose livre no tecido muscular entre os animais mantidos com a dieta HC e os mantidos com a dieta HP.

Assim como no hepatopâncreas, o extrato de pedúnculos oculares produziu um aumento da glicose livre muscular que foi observado somente nos animais submetidos a uma dieta HP, sendo que naqueles animais que sofreram a injeção de extrato de pedúnculos HP, esses níveis foram 8,3 vezes maiores que o grupo controle. Nos animais alimentados com uma dieta HC, não foi observado nenhuma alteração da glicose livre muscular. Foi observado que a diferença no modo de ação dos extratos de pedúnculos sobre os níveis de glicose livre do músculo de animais alimentados com uma dieta HP ou com uma dieta HC provavelmente deva-se ao tipo de dieta a qual os animais foram submetidos, e não somente ao efeito da injeção do CHH dos pedúnculos oculares provenientes de animais alimentados com as diferentes dietas.

Nos animais alimentados com dieta HC e injetados com extrato de pedúnculos HC, embora não tenha ocorrido aumento da glicose livre muscular, houve uma diminuição significativa dos níveis de glicogênio.

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que nos animais alimentados com uma dieta HP, os níveis de glicose hemolinfática, hepatopancreática e muscular aumentaram, confirmando o efeito hiperglicemiante da injeção de extrato de pedúnculos, independentemente da dieta de origem do

extrato. Ainda, os resultados demonstram que a hiperglicemia observada nos animais alimentados com uma dieta HP deva-se, principalmente, às custas do glicogênio hepatopancreático.

Nos animais alimentados com uma dieta HC, o efeito hiperglicemiante do extrato de pedúnculos proveniente de animais HC e de animais HP, foi constatado sobre a glicose hemolinfática. No entanto, não foi observada diminuição dos níveis de glicogênio no hepatopâncreas desses animais, indicando que o aumento da glicose circulante, provavelmente, deva-se a glicogenólise ocorrida em outro(s) tecido(s) e/ou por outras vias metabólicas que não a glicogenólise.

Johnston e cols. (1972) estudando comparativamente os níveis de carboidratos na hemolinfa e no hepatopâncreas de *C. maenas* verificaram que 75-80% dos carboidratos nos hemócitos são polissacarídeos, principalmente, glicogênio, enquanto que nos hepatopancreócitos essa porcentagem cai para 10-20%. Johnston e cols. (1973) identificaram a presença de glicose-6-fosfatase nos hemócitos e, através de microscopia eletrônica, demonstraram grande conteúdo de glicogênio estocado. Estes trabalhos reforçam a hipótese de que o tecido de reserva de glicogênio dos crustáceos seria, primordialmente, a hemolinfa e secundariamente o hepatopâncreas.

Partindo-se dos resultados obtidos por Johnston e cols. (1972, 1973) e de Kucharski e Da Silva (1991a) os resultados obtidos neste trabalho, demonstrariam que:

1. Em relação ao modo de ação do CHH nos animais alimentados com uma dieta HP → como essa dieta fornece baixo aporte de carboidratos, tanto os níveis de glicose circulante, como de glicose e glicogênio tecidual são baixos. O

CHH agiria aumentando os níveis de glicose circulante a partir das reservas de glicogênio dos hemócitos, dos hepatopancreócitos e do músculo, nessa ordem respectivamente.

2. Em relação ao modo de ação do CHH nos animais alimentados com uma dieta HC → como nessa dieta o aporte de carboidratos é mais elevado, produzindo um aumento nos níveis de glicose circulante, glicose livre e glicogênio muscular e hepatopancreático sendo esse aumento, provavelmente, verificado também nos hemócitos. Sendo assim, o CHH agiria nos hemócitos, estimulando a conversão de glicogênio em glicose que seria, então liberada para a hemolinfa. Como os níveis de glicogênio nessas células, provavelmente, sejam bem maiores que os verificados na dieta HP, este seria suficiente para produzir a hiperglicemia verificada nos animais submetidos à dieta HC, ocorrendo uma insignificante mobilização das reservas de glicogênio hepatopancreático.

Para comprovar essa hipótese serão necessários estudos posteriores avaliando diretamente os níveis de carboidratos dos hemócitos tanto de animais HP, como HC, assim como a ação do CHH sobre os mesmos.

Os resultados aqui encontrados confirmam a ação hiperglicemiante do CHH de extrato de pedúnculos oculares sobre o metabolismo de carboidratos do caranguejo *Chasmagnathus granulata* e destacam a importância da dieta na atividade enzimática, ação hormonal e, conseqüentemente, na homeostasia desse animal.

5. Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a profa. Dra. Roselis S.M. da Silva e aos colegas do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), pelo auxílio incondicional; ao CNPq, CAPES e FAGERGS pelo auxílio financeiro.

FIGURAS

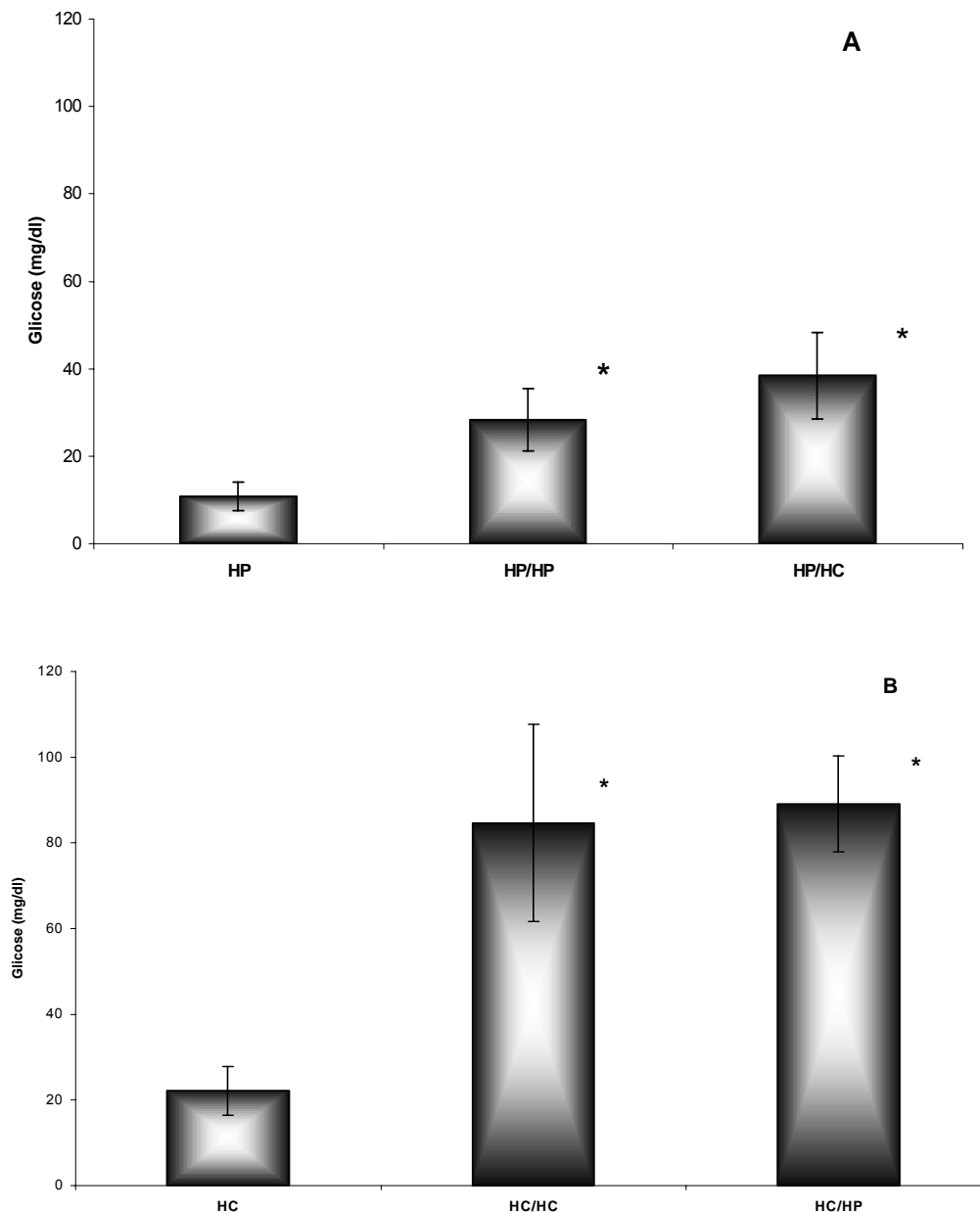


Fig. 1: Concentração de glicose na hemolinfa de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (HP) e carboidratos (HC) após 45 min de injeção com extrato de pedúnculos:

- A) Animais alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HP/HP); injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HP/HC);
- B) Animais alimentados com dieta HC, injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HC/HC); injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HC/HP).

Os dados estão expressos como média \pm DP.

O número de animais em cada grupo variou de 3 a 5.

*: Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

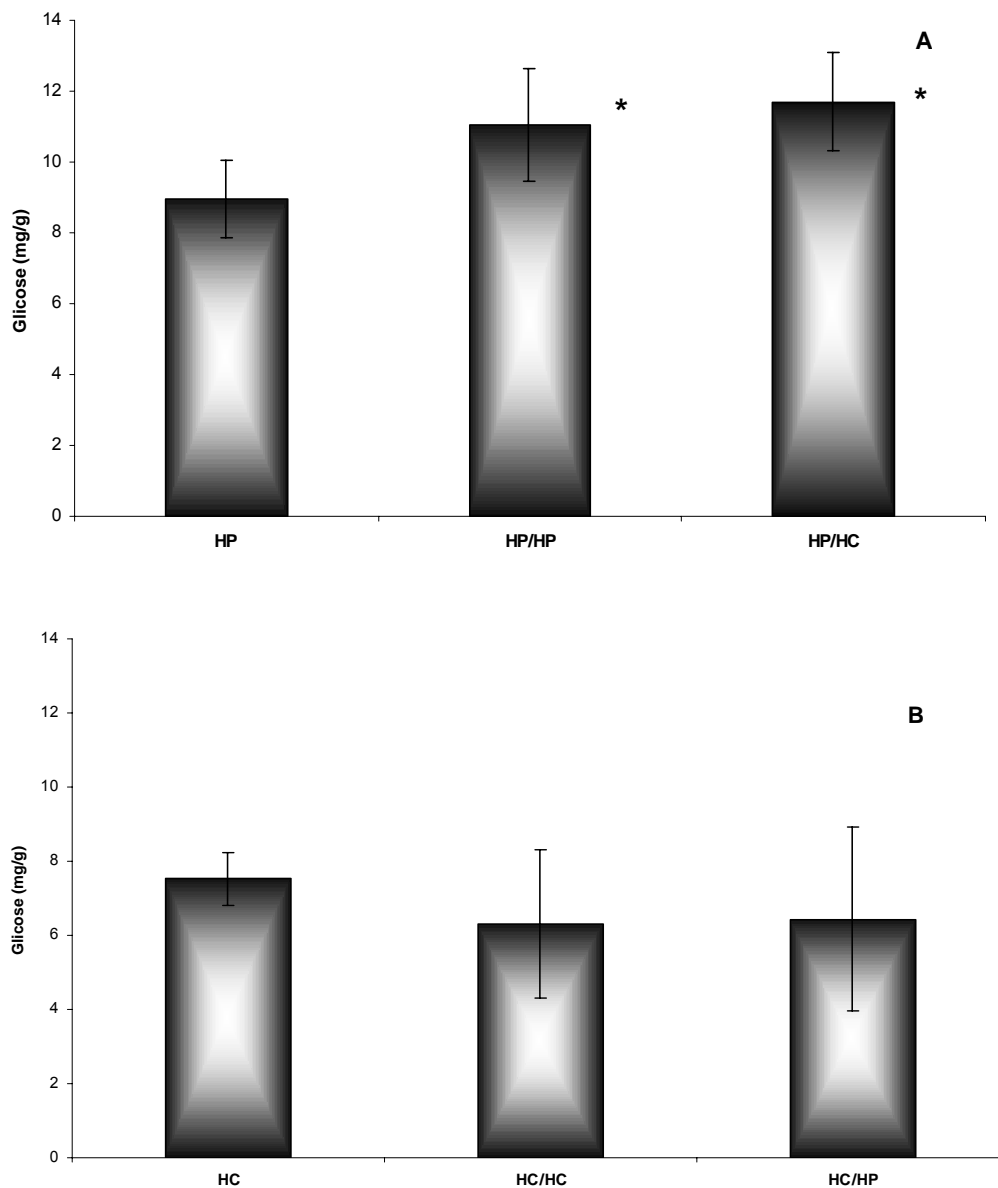


Fig. 2: Concentração de glicose livre no hepatopâncreas de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (HP) e carboidratos (HC) após 45 min de injeção com extrato de pedúnculos:

- A) Animais alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HP/HP); injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HP/HC);
- B) Animais alimentados com dieta HC, injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HC/HC); injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HC/HP).

Os dados estão expressos como média \pm DP.

O número de animais em cada grupo variou de 3 a 5.

*: Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

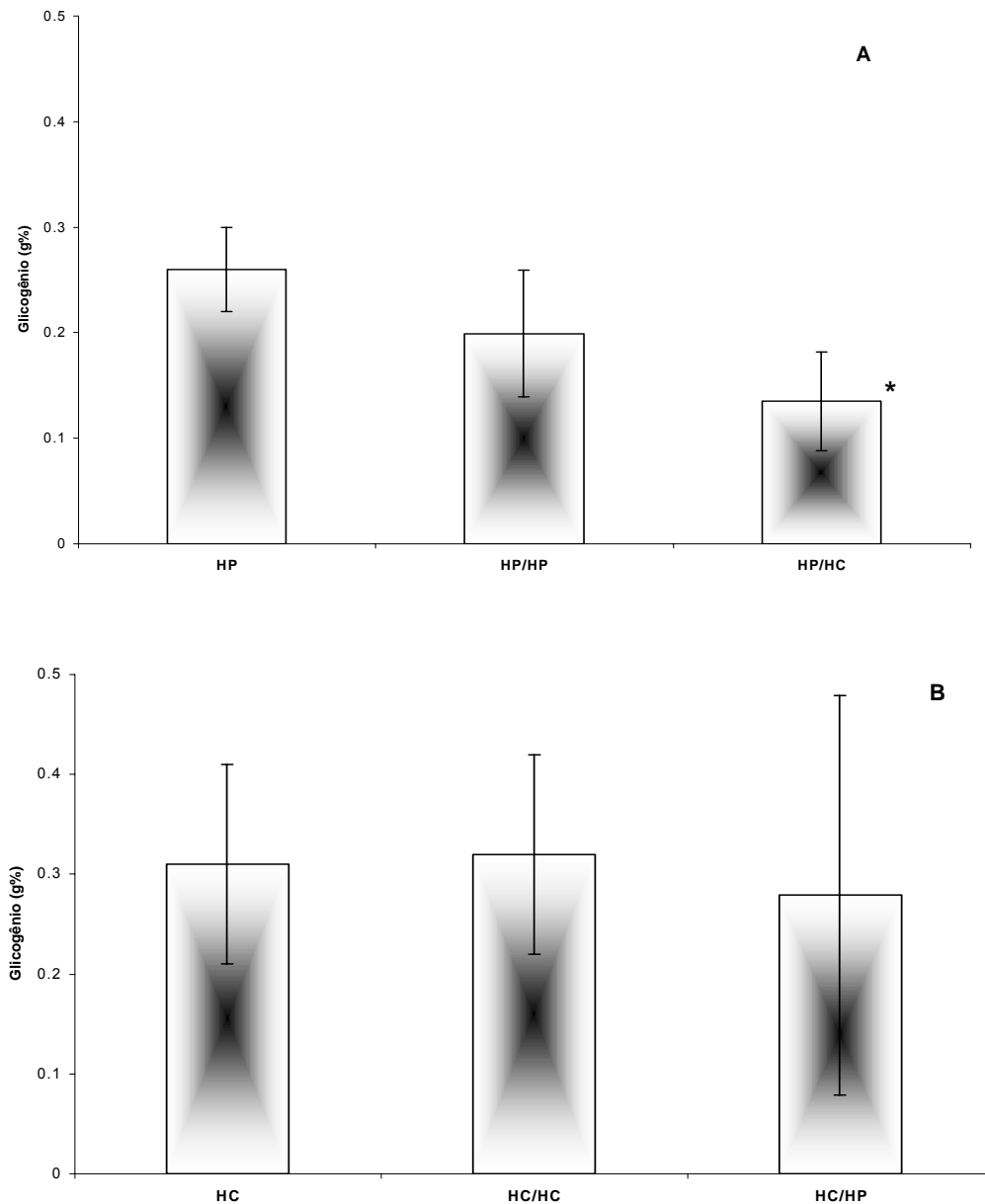


Fig. 3: Concentração de glicogênio em Hepatopâncreas de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (HP) e carboidratos (HC) após 45 min de injeção com extrato de pedúnculos:

- A) Animais alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HP/HP); injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HP/HC);
- B) Animais alimentados com dieta HC, injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HC/HC); injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HC/HP).

Os dados estão expressos como média \pm DP.

O número de animais em cada grupo variou de 3 a 5.

*: Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

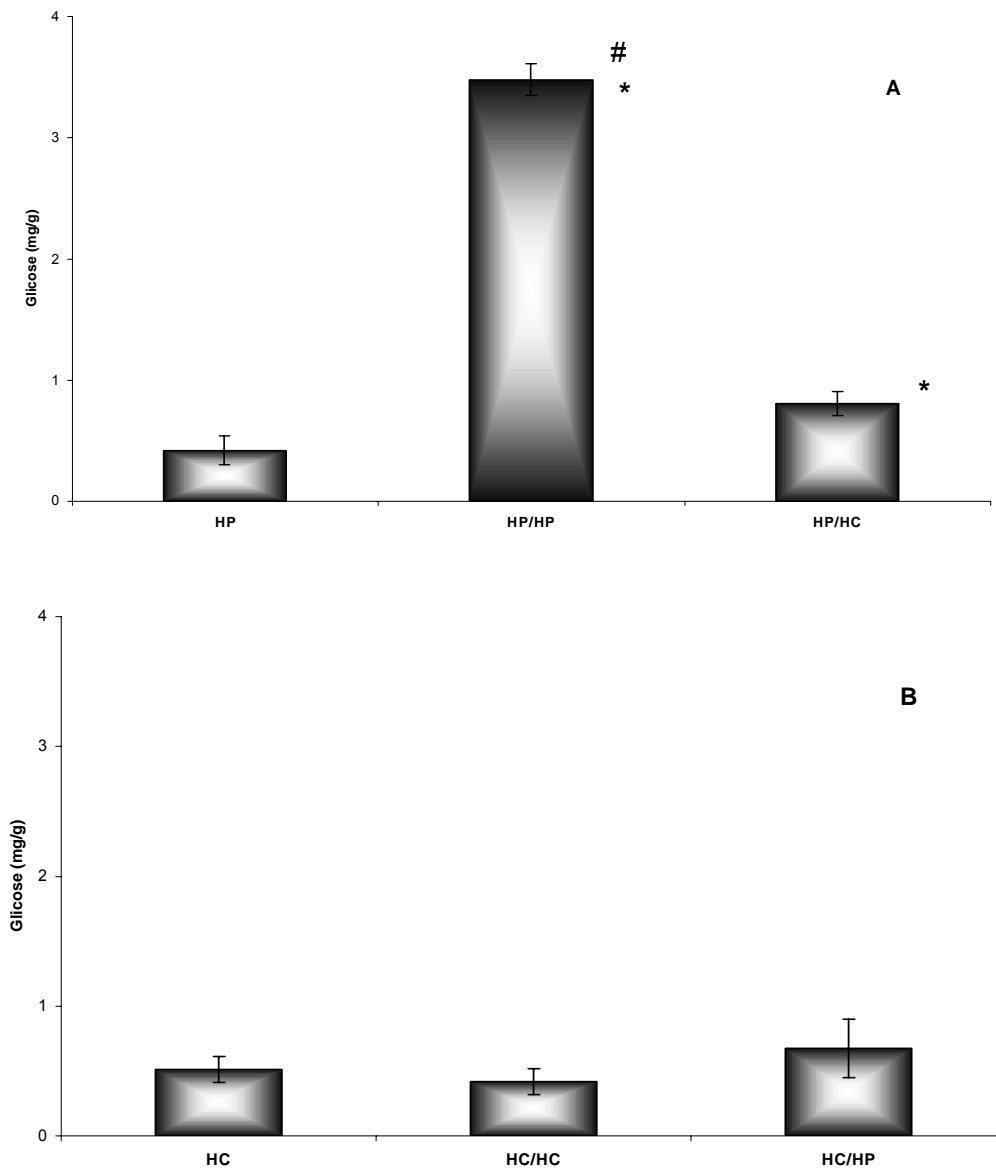


Fig. 4: Concentração de glicose livre no músculo de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (HP) e carboidratos (HC) após 45 min de injeção com extrato de pedúnculos:

- A) Animais alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HP/HP); injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HP/HC);
- B) Animais alimentados com dieta HC, injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HC/HC); injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HC/HP).

Os dados estão expressos como média \pm DP.

O número de animais em cada grupo variou de 3 a 5.

*: Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

#: Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

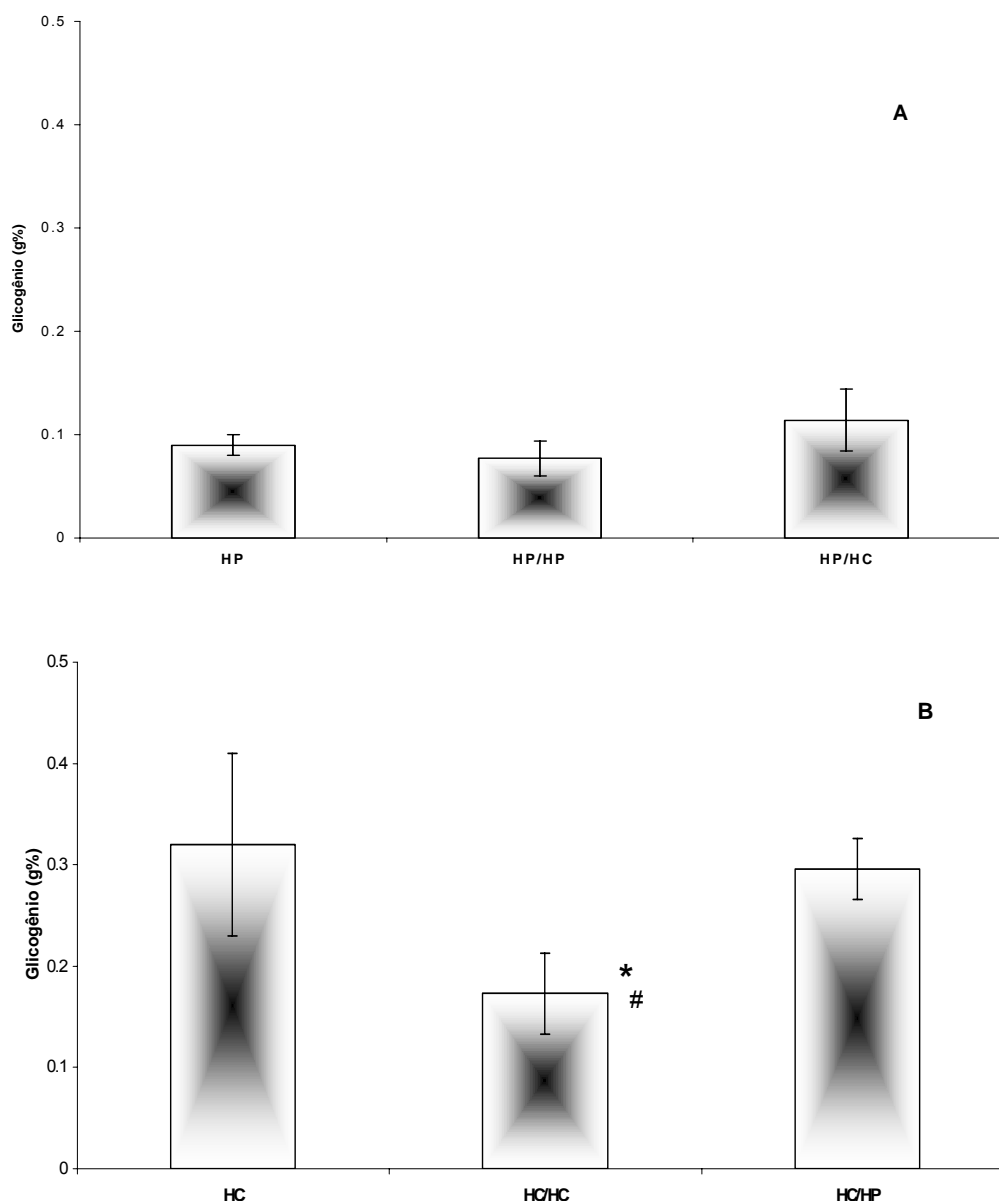


Fig. 5: Concentração de glicogênio no músculo de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas (HP) e carboidratos (HC) após 45 min de injeção com extrato de pedúnculos:

- A) Animais alimentados com dieta HP, injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HP/HP); injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HP/HC);
- B) Animais alimentados com dieta HC, injetados com extrato de pedúnculos de animais HC (HC/HC); injetados com extrato de pedúnculos de animais HP (HC/HP).

Os dados estão expressos como média \pm DP.

O número de animais em cada grupo variou de 3 a 5.

*: Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

#: Diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais.

6. Referências Bibliográficas

- Abramowitz, A.A., Hisaw, F.L., Papandrea, D.N., 1944. The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *Biol. Bull.* 86, 1-5.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B (3), 447-449.
- Drach, F., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie Milieu* 161, 595-607.
- Geary, N., Langhans, W., Scharrer, E., 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.* 241(10), R330-R335.
- Herreid, C.F., Full, R.J., 1998. Energetics and locomotion. In: Macmahon, B. (ed), *Biology of Land Crabs*. Cambridge University Press, Cambridge, 337-377.
- Glowik, R. M., Golowasch, J., Keller, R., Marder, E., 1997. D-Glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *J. Experim. Biol.* 200, 1421-1431.
- Johnston, M.A., Davies, P.S., 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B, 433-443.
- Johnston, M.A., Elder, H. Y., Davies, P.S., 1973. Cytology of *Carcinus* haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 46A, 569-581.
- Kallen, J.L., Abrahamse, S.L., Van Herp, F., 1990. Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. *Biol. Bull.* 179, 351-357.
- Kegel, G., Richwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J., Keller, R., 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. *FEBS Lett.* 255, 10-14.
- Keller, R., Andrew, E.M., 1973. The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocr.* 20, 572-578.

- Keller, R., Sedlmeier, D., 1988. A metabolic hormone in Crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In Laufer H., Downer, R.G.H., (eds): "Endocrinology of selected invertebrates. Vol. 2 of Invertebrate Endocrinology, "New York: Alan R. Liss, pp 315-326.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991(a). Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 100A (3), 599-602.
- Kummer, G., Keller, R., 1993. High-affinity Binding of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) to Hepatopancreatic Plasma Membranes of the Crab *Carcinus maenas* and the Crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* 14, 103-108.
- Morris, S., Airries, C.N., 1998. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. *S. Afr. Zool.* 33, 87- 106.
- 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.
- Oliveira, G.T., 1998. Metabolismo de carboidratos em caranguejos *Chasmagnathus granulata*. Alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos a diferentes períodos de anoxia ambiental e de recuperação. Porto Alegre, UFRGS, 1998. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS-Brasil.
- Ollivaux, C., Soyeux, D., 2000. Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5106-5114.
- Santos, E.A., Colares, E.P., 1986. Blood glucose regulation in an intertidal crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 83A (4), 673-675.
- Santos, E.A., Keller, R., 1993 (a). Effect of exposition to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (2), 343-347.
- Santos, E.A., Keller, R., 1993 (c). Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone – evidence for a dual feedback control system. *J. Comp. Physiol. B* 163, 374-379.

- Santos, E.A., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A (3), 329-332.
- Santos, E.A., Stefanello, T.M., 1991. The hemolymph of *Chasmagnathus granulata* ,Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) as a target tissue of the crustacean hyperglycaemic hormone. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24 (3), 267-270.
- Schein, V., 1999. Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Dissertação (Tese de Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS-Brasil.
- Sedlemeier, D. (1982) The mode of action of the crustacean hyperglycemic neurosecretory hormone (CHH).II. Involvement of glycogen synthetase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47, 426-432.
- Sedlmeier, D., 1987. The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A, 423-425.
- Van Handel, E. 1965. Estimulation of glycogen in small amounts of tissue. *Analyt. Biochem.* 11, 256-265.
- Vinagre, A.S. 1999. Metabolismo de Carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: Efeito do jejum e da realimentação e da apedunculacão sobre a adaptação ao estresse hiposmótico. Porto Alegre: UFRGS 1999. Dissertação (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS-Brasil.
- Vinagre, A.S., Da Silva, R.S.M., 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crab previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Com. Biochem. Physiol.* 102 (3), 579-583.
- Webster, S.G, 1993. High affinity binding of putative moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to membrane bound receptors on the Y-Organ of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 251, 53-59.

Resultados Complementares

2.4. Efeito *in vivo* do extrato de pedúnculo sobre a atividade da glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e ativa (GFA) no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta HC

Uma das hipóteses mais defendidas pelos pesquisadores, quanto ao papel do CHH, é a de que este exerce uma ação sobre as reservas de carboidratos fazendo a conversão de glicogênio em glicose, através do aumento da atividade da glicogênio-fosforilase (GF).

Sedlmeier, em 1982, através de estudos *in vivo* no lagostim *O. limosus*, verificou que a atividade da glicogênio-sintase (GS) aumentava após ablação bilateral dos pedúnculos, sendo esse efeito revertido, após injeção de CHH. No entanto, esse autor verificou que, embora os níveis de atividade da GS voltassem ao normal, uma considerável quantidade de glicogênio continuava a ser sintetizada, mesmo em presença de CHH. Esses resultados, aliados à diminuição da taxa de incorporação de glicose em glicogênio, em até 50%, em estudos do hepatopâncreas do mesmo animal, *in vitro* levaram esse autor a concluir que a concentração de glicose no meio influenciaria a síntese de glicogênio, agindo sobre a GF (Sedlemeier, 1987).

Oliveira (1998) comparando a atividade da glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e na forma ativa (GFA), sobre o metabolismo de carboidratos do hepatopâncreas de *C. granulata* expostos a diferentes tempos de anoxia e

recuperação da anoxia, não observou diferença significativa na atividade da GFT entre os animais alimentados com dieta HC ou HP. No entanto, a atividade da GFA comparada a GFT dos animais HC foi de 98%, enquanto que nos animais HP foi de 66%. Este autor sugere que a concentração de glicogênio intracelular controle sua mobilização, via interconversão da forma *b* para a forma *a* da glicogênio-fosforilase, através de um sistema de retroalimentação entre os níveis de glicogênio tecidual e o sistema fosforilase.

Kummer e Keller (1993) identificaram um grande número de receptores com alta afinidade para o CHH nas membranas dos hepatopancreócitos de *O. limosus* e *C. maenas*. Tendo em vista que, o CHH de crustáceos tem a mesma resposta metabólica sobre os níveis de glicose circulante, assim como o glucagon de vertebrados, este também atuaria estimulando a GF. Ainda, como nos animais alimentados com uma dieta HC, os níveis de glicogênio hepatopancreático são maiores que nos animais HP, a ação da GF poderia ser melhor observada.

No presente trabalho, foram realizados experimentos para a verificação da atividade da GF no hepatopâncreas de animais HC, injetados com extrato de pedúnculos HP (HC/HP) e HC (HC/HC).

Na figura 6 pode ser observado no grupo controle que há uma diferença de 35% entre os níveis de GFT e GFA. Nos grupos experimentais, essa diferença diminui para 7% no grupo HC/HC e se mantém, praticamente igual ao controle (33%) no grupo HC/HP.

Não há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais nem em relação ao controle, nem entre os tratamentos para GFT.

Ocorreu uma diminuição significativa do grupo HC/HC em relação ao controle para GFA, mas não há diferença significativa do grupo HC/HP em relação ao controle. Observou-se um aumento significativo no grupo HC/HP em relação ao HC/HC.

Vinagre (1999) observou que nos animais alimentados com uma dieta HP, a administração do meio resultante da incubação de 4 pedúnculos oculares não alterou significativamente os valores de glicose hemolinfática, sendo necessário aumentar o número de pedúnculos no meio de incubação para 8 ou 12 para ser observado o mesmo efeito hiperglicemiante apresentado pelos animais HC. Baseado nesses resultados o autor sugere que a administração prévia de uma dieta HP levaria a um aumento na resistência tecidual periférica a ação do CHH. Com isso, a síntese e a liberação do hormônio estaria aumentada, o que explicaria a necessidade de incubar um maior número de pedúnculos oculares para a obtenção de uma hiperglicemia. Assim, o inverso provavelmente ocorra com pedúnculos oriundos de animais HC, que teriam muito mais CHH do que àqueles originados de animais alimentados com dieta HP.

Ao contrário do observado em vertebrados na ação do glucagon sobre a GFA (Lenninger, 2000), após a injeção de extrato de pedúnculos oriundos de animais HC, ou seja, com mais CHH ocorre uma diminuição significativa da GFA no hepatopâncreas de animais submetidos a dieta HC, em relação ao grupo controle, que não é observada nos animais injetados com extrato de pedúnculos HP.

No presente trabalho, foi observado um valor 35% menor nos níveis da GFA em relação aos níveis da GFT. Oliveira (1998) comparou a atividade da

glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e na forma ativa (GFA), sobre o metabolismo de carboidratos do hepatopâncreas de *C. granulata* expostos a diferentes tempos de anoxia e recuperação da anoxia. Este autor observou que a GFA comparada a GFT dos animais HC foi de 98%. Como já mencionado anteriormente, Sedlemeier (1982), estudando o lagostim *O. limosus in vivo* identificou o hepatopâncreas como tecido alvo do CHH. Esse mesmo autor, estudando o hepatopâncreas do mesmo animal *in vitro*, em 1987, concluiu que a concentração de glicose no meio influenciaria a síntese de glicogênio, agindo sobre a glicogênio-fosforilase (GF).

Como observado nas fig 3 e 4 tanto os níveis de glicose, como os de glicogênio são elevados no hepatopâncreas, pois o mesmo é caracterizado como um tecido de reserva de carboidratos do *C. granulata*, principalmente no período de inverno (Herreid e Full, 1988; Kucharski e Da Silva, 1991; Turcato, 1990; Vinagre e Da Silva 1992), o que confirmaria a diferença de 35% entre os níveis de GFA em relação aos de GFT no grupo controle. Além disso, é sabido que a atividade enzimática no hepatopâncreas de crustáceos é muito alta, devido a este tecido ser um sítio de armazenamento e conversão de substratos energéticos em várias situações de estresse pelas quais os crustáceos passam. Por isso esse tecido deve sofrer um congelamento imediato, logo após sua retirada do animal, para que nenhuma ação enzimática, seja da GF ou de outras enzimas possam atuar, entretanto no trabalho de Oliveira (1998, 2001), segundo os materiais e métodos, isso não foi observado.

Segundo Santos e Keller (1993) analisando o trabalho de Vinagre e Da Silva (1992) uma rápida diminuição dos níveis do glicogênio hepatopancreático

em animais alimentados com uma dieta HC, durante jejum e aumentada glicemia, indicariam um paradoxo, que poderia ser explicado se considerarmos a possibilidade de que a glicogênio-fosforilase e a glicogênio-sintase possam ser influenciadas pela concentração de glicogênio nos tecidos, similarmente ao que ocorre em mamíferos (Munger e cols., 1993) e moluscos (Rossi, 1992; Hemminga 1985 b).

Assim, os resultados demonstram que a dieta, de alguma forma, interfere na ação das enzimas, assim como na resposta à ação do CHH.

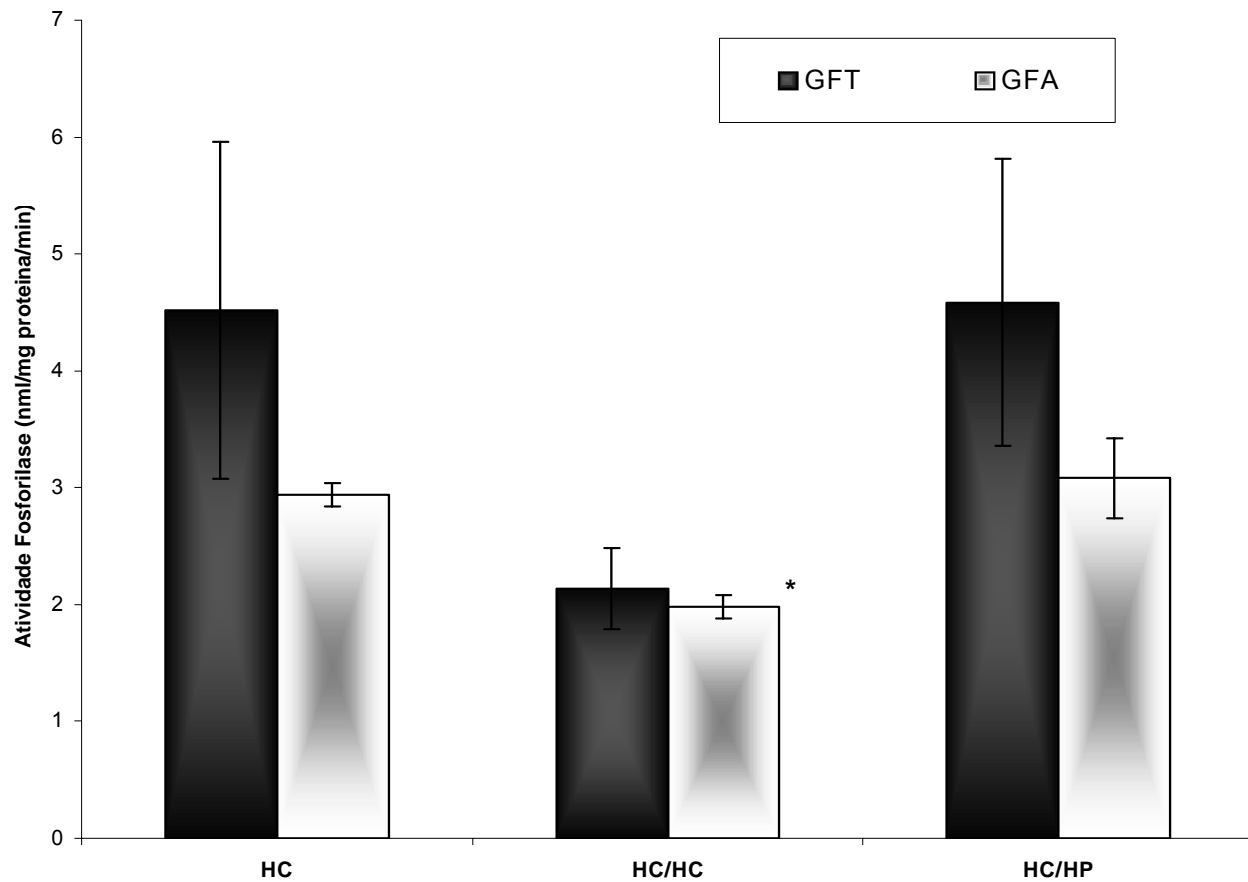


Fig. 6: Atividade da glicogênio-fosforilase na forma total (GFT) e ativa (GFA) em hepatopâncreas de *C. granulata* submetidos a uma dieta HC:

HC/HC: animais injetados com extrato de pedúnculo de animais HC;

HC/HP: animais injetados com extrato de pedúnculos de animais HP.

Os resultados estão expressos como média \pm DP.

Foram usadas duas amostras, de um pool de 5 animais, cada, para cada grupo experimental.

O tecido foi coletado, após 45 min de injeção do extrato de pedúnculos com CHH.

*: diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

3.2- Efeito *in vitro* do extrato de pedúnculo sobre a captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta HC

Vários autores, baseados nos resultados obtidos em experimentos que avaliam a glicemia e/ou glicose livre de diferentes tecidos em vários crustáceos, sugeriram que a hiperglicemia causada pelo CHH seria devida, em parte, pela diminuição da utilização e/ou captação de glicose pelos tecidos e não somente pelo aumento da degradação de glicogênio (Santos e cols., 1988; Santos e Stefanello, 1991; Scheer e Scheer, 1951).

No presente estudo observamos que, em relação a captação, pelo menos no hepatopâncreas de *C. granulata* alimentados com uma dieta HC, ocorreu justamente o oposto. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C no grupo alimentado com dieta HC que recebeu injeção de extrato de pedúnculo de animais HC (HC/HC). Não foi observada diferença significativa nem do grupo que recebeu extrato de pedúnculos de animais HP (HC/HP) em relação ao controle, nem entre os grupos experimentais (Fig. 7).

Ainda podemos verificar que os resultados dos níveis de carboidratos *in vivo*, demonstraram que a liberação de glicose livre é insignificante, bem como a mobilização de glicogênio no hepatopâncreas de animais HC.

Ambos os extratos de pedúnculos aumentaram a captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C. No entanto, o aumento de 30% no grupo HC/HC comparado ao de

15% (não significativo) no grupo HC/HP deveu-se, provavelmente, a maior quantidade de CHH presente no extrato de pedúnculos de animais HC.

Aliando-se esses resultados com o equilíbrio fino existente entre a GS e a GF no processo de síntese e quebra de glicogênio, e os resultados obtidos por Vinagre (1999) que propõe uma maior concentração e/ou atividade do CHH nos pedúnculos de animais HC, podemos inferir que:

a. Por ter maior concentração e/ou atividade do CHH, o extrato de pedúnculos proveniente de animais HC promoveu aumento na captação de glicose, contrariamente ao esperado numa dieta HP;

b. O aumento na entrada de glicose nas células do hepatopâncreas (Fig. 7) dos animais HC/HC, causaria uma diminuição na atividade da glicogênio-fosforilase (fg. 6) e um possível aumento da GS.

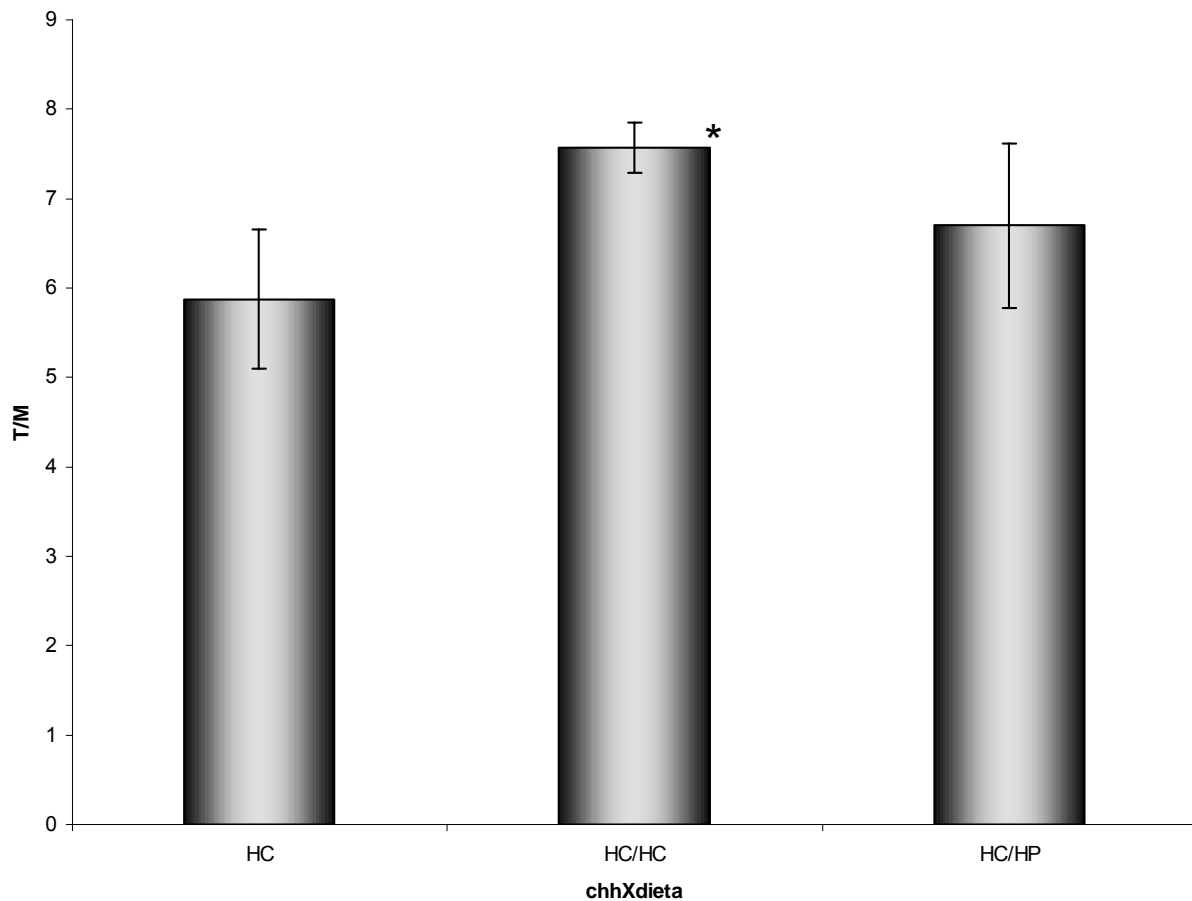


FIG. 7: Efeito *in vitro* do extrato de pedúnculo sobre a captação de 2-Deoxy-D-Glicose-1-¹⁴C no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta HC injetado com extrato de pedúnculos de animais HC (HC/HC) e de animais HP (HC/HP).

Os dados estão expressos como média ± DP.

O número de animais usados para cada grupo foi de 4 ou 5.

*: Diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

Desde que foi constatada a existência de um “fator diabetogênico” até o sequenciamento e elucidação da estrutura do CHH, muito pouco foi revelado, sobre seu papel fisiológico. Em busca do aperfeiçoamento na aquicultura e da criação comercial de crustáceos, foram desenvolvidos estudos no sentido de promover a clonagem do hormônio para utilização do mesmo em animais de criatório, mas seu mecanismo de ação, as rotas metabólicas, e a pleiotropia de suas funções são ainda um mistério aos pesquisadores (Chung e Webster, 2003; Chung e cols., 1999; Chang e cols., 1998; Udomkit e cols., 2004).

Este trabalho não tem a pretensão de elucidar todos os pontos do papel fisiológico do CHH, muito menos, no metabolismo de crustáceos, mas compõe uma parte no “quebra-cabeças” do estudo do metabolismo e endocrinologia comparados.

Podemos comprovar o papel hiperglicemiante do extrato de pedúnculos contendo CHH. Bem como, a importância da dieta na ação hormonal, e no metabolismo das reservas de carboidratos em *Chasmagnathus granulata*.

Assim, nos animais submetidos a uma dieta HP, a origem da glicose vista na hiperglicemia deste caranguejo viria das reservas de glicogênio teciduais, constatadas pela diminuição desse polissacarídeo no hepatopâncreas e no músculo. Já na dieta HC, o aumento da glicemia observado seria devido, ou a outra rota metabólica que não a glicogenólise, ou a glicogenólise de outro(s) tecido(s) que não o hepatopâncreas e o músculo, visto que os níveis de glicogênio de ambos esses tecidos não sofreram alterações nessa dieta (tabela 2).

TABELA 2: Níveis de carboidratos na hemolinfa, hepatopâncreas e músculo de *C. granulata* submetidos as dietas HP e HC, injetados com extarto de pedúnculos provenientes de animais HP e HC. (*: valores com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle):

	Controle		Extr. de Ped. de animais HP (CHH-HP)		Extr. de Ped. de animais HC (CHH-HC)	
	Dieta HP	Dieta HC	Dieta HP (HP/HP)	Dieta HC (HC/HP)	Dieta HP (HP/HC)	Dieta HC (HC/HC)
Glicemia	10,77 ($\pm 3,2$)	22,13 ($\pm 5,7$)	28,27* ($\pm 7,1$)	89,01* ($\pm 11,2$)	38,42* ($\pm 9,8$)	84,68* (± 23)
Gl. Livre Hepatop.	8,96 ($\pm 1,1$)	7,53 ($\pm 0,7$)	11,05* ($\pm 1,6$)	6,43 ($\pm 2,5$)	11,7* ($\pm 1,4$)	6,32 (± 2)
Glicog. Hepatop.	0,26 ($\pm 0,04$)	0,31 ($\pm 0,1$)	0,2 ($\pm 0,06$)	0,28 ($\pm 0,2$)	0,135* ($\pm 0,05$)	0,32 ($\pm 0,1$)
Gl. Livre Músculo	0,42 ($\pm 0,1$)	0,51 ($\pm 0,1$)	3,48* ($\pm 0,1$)	0,675 ($\pm 0,2$)	0,81* ($\pm 0,1$)	0,42 ($\pm 0,1$)
Glicog. Músculo	0,09 ($\pm 0,01$)	0,32 ($\pm 0,1$)	0,077 ($\pm 0,02$)	0,296 ($\pm 0,03$)	0,114 ($\pm 0,03$)	0,173* ($\pm 0,04$)

Seguindo a segunda hipótese, temos suporte na literatura para sugerir o papel dos hemócitos como tecido primordial na mobilização de carboidratos, em especial de glicogênio.

Para comprovar tal hipótese, uma nova linha de estudos deve ser desenvolvida, no sentido de isolar, quantificar e analisar o papel dos hemócitos na mobilização das reservas de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata* para, posteriormente, elucidar a ação do CHH e de outros hormônios na mobilização das reservas de carboidratos dessas células.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos de captação e da atividade da GF demonstraram o quanto é desconhecido o mecanismo de ação desse hormônio, pelo menos no que se refere a influência da composição da dieta, pois aparentemente contrariam os conceitos clássicos estabelecidos pelos pesquisadores, visto que as linhas de pesquisa baseiam-se na dieta de proteínas.

Estudos posteriores serão necessários para identificar no hepatopâncreas a importância do tempo de incubação deste tecido oriundo tanto de animais HP, como HC, injetados com extrato de pedúnculos de animais HP e HC.

Os resultados aqui encontrados confirmam a ação hiperglicemiante do CHH de extrato de pedúnculos oculares sobre o metabolismo de carboidratos do caranguejo *Chasmagnathus granulata* e destacam a importância da dieta na atividade enzimática, ação hormonal e, conseqüentemente, na homeostasia desse animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Abramowitz, A.A., Hisaw, F.L., Papandrea, D.N., 1944. The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *Biol. Bull.* 86, 1-5.
- Alexandrowicz, J.S., 1952. Notes on the nervous system in the Stomatopoda. I. The system of median connectives. *Publ. Stazione Zool. Napoli*, 23, 201-214.
- Bauchau, A.G., Mengeot, J.C., Olivier, M.A., 1968. Action de la sérotonine et de l'hormone diabétogène des crustacés sur la phosphorylase musculaire. *Gen. Comp. Endocrinol.* 11, 132-138.
- Beltz, A.G., Mengeot, J.C., 1966. Sérotonine et glycémie chez les crustacés *Experientia* 22, 238-239.
- Bliss, D.E., 1951. Metabolic effects of sinus gland or eyestalk removal in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Anat. Rec.* 111, 502-503.
- Boschi, E.E., 1964. Los crustaceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)* 6, 1-76.
- Botto, J.L., Irigoyen, H.P., 1980. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. Contribuición al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del río Salado, provincia de Buenos Aires. *Sem. Latinoam. Ecol. Bentónica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur. UNESCO-Montevideo*, 161-169.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brown, F.A., Jr. 1946. The source and activity of *Crago*-darkening hormone (CDH). *Physiol. Zool.*, 19, 215-223.
- Busatto, M.L., 2002. Efeito de diferentes tempos de administração de uma dieta rica em carboidratos (RC) ou em proteínas (RP) sobre as reservas de carboidratos em *Chasmagnathus granulata* (Decapoda; Grapsidae). Porto Alegre: UFRGS 2002. Dissertação (Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas-Fisiologia)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS-Brasil.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.* 77B (3), 447-449.

- Chang, E.S., Keller, R., Chang, S., 1998. Quantification of crustacean hyperglycaemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster *Homarus americanus*, following various stresses. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 359-366.
- Charmantier-Daures, M., Charmantier, G., Janssen, K.P.C., Ainken, D.E., Van-Herp, F., 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult american lobster *Homarus americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94 (3), 281-293.
- Chung, J.S., Dircksen, H., Webster, S.G., 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycaemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *PNAS*, 96 (23), 13103-13107.
- Chung, J.S., Webster, S.G., 2003. Moulting cycle-related changes in biological activity of moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas* (From target to transcript). *Eur. J. Biochem.* 270, 3280-3288.
- D'Incao, F., Ruffino, M.L., Silva, K.G., Braga, A.C. 1990. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). *Atlântida* 12 (2), 85-93.
- Drach, F., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie Milieu* 161, 595-607.
- Edwards, G., Weston, A.H., 1993. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *A. Rev. Pharmac. Toxicol.* 33, 397-637.
- Fingerman, M., 1997. Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiol. Zool.* 70 (3), 257-269.
- Fingerman, M., Nagabhushan, R., 1992. Control of release of crustacean hormones by neuroregulators. *Comp. Biochem. Physiol.* 102C (3), 343-352.
- Gaxiola, G., Cuzon, G., Garcia, T., Taboada, G., Brito, R., Chimal, M.E., Paredes, A., Soto, L., Rosas, C., van Wormhoudt, A., 2005. Factorial effects of salinity, dietary carbohydrate and moulting cycle on digestive carbohydrases and hexokinases in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Comp. Biochem. Physiol.* Part A:140, 29-39.
- Geary, N., Langhans, W., Scharrer, E., 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.* 241(10), R330-R335.
- Herreid, C.F., Full, R.J., 1998. Energetics and locomotion. In: Macmahon,

- B. (ed), Biology of Land Crabs. Cambridge University Press, Cambridge, 337-377.
- Gilles, R., 1997. "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 117A, 279-290.
- Glowik, R. M., Golowasch, J., Keller, R., Marder, E., 1997. D-Glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *J. Experim. Biol.* 200, 1421-1431.
- Hemminga, M.A., Maaskant, J.J., Joosse, J., 1985 (b). Direct effects of the factor of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* on isolated glycogen cells. *Gen. Comp. Endocr.* 58, 131-136.
- Hemminga, M.A., Maaskant, J.J., Koomen, W., Joosse, J., 1985 (a). Neuroendocrine control of glycogen mobilization in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Gen. Comp. Endocr.* 57, 117-123.
- Herreid, C.F., Full, R.J., 1998. Energetics and locomotion. In: Macmahon, B. (ed), *Biology of Land Crabs*. Cambridge University Press, Cambridge. P. 337-377.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., Schneider, D.E., Freed, J.M., 1970. The organization and control of metabolism in crustacean gill. *Comp. Biochem. Physiol.* 33, 529-548.
- Johnston, M.A., Davies, P.S., 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 41B, 433-443.
- Johnston, M.A., Elder, H. Y., Davies, P.S., 1973. Cytology of *Carcinus* haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 46A, 569-581.
- Kallen, J.L., Abrahamse, S.L., Van Herp, F., 1990. Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. *Biol. Bull.* 179, 351-357.
- Karádi, Z., Oomura, Y., Nishino, H., Scott, T.R., Lénárd, L., Aou, S., 1992. Responses of lateral hypothalamic glucose-sensitive and glucose-insensitive neurons to chemical stimuli in behaving Rhesus monkeys. *J. Neurophysiol.* 67, 389-400.

- Kegel, G., Richwein, B., Weese, S., Gaus, G., Peter-Katalinic, J., Keller, R., 1989. Amino acid sequence of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab *Carcinus maenas*. FEBS Lett. 255, 10-14.
- Keller, R. 1965. Über eine hormonale Kontrolle des Polysaccharidstoffwechsels beim Flusskrebs *Cambarus maenas*. Z. Vgl. Physiol. 51:49–59.
- Keller, R., 1992. Crustacean neuropeptides: Structures, functions and comparative aspects. Experientia 48, 439-448.
- Keller, R., Andrew, E.M., 1973. The site of action of the crustacean hyperglycemic hormone. Gen. Comp. Endocr. 20, 572-578.
- Keller, R., Haylet, B., Cooke, A., 1994. Neurosecretion of crustacean hyperglycaemic hormone evoked by axonal stimulation or elevation of saline K⁺ concentration quantified by a sensitive immunoassay method. J. Exp. Biol. 188, 293-316.
- Keller, R., Orth, H.P., 1990. Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. Progress Comp. Endocrinol. 265-271. Wiley-Liss, INC.
- Keller, R., Sedlmeier, D., 1988. A metabolic hormone in Crustaceans: The hyperglycemic neuropeptide. In Laufer H., Downer, R.G.H., (eds): "Endocrinology of selected invertebrates. Vol. 2 of Invertebrate Endocrinology, "New York: Alan R. Liss, pp 315-326.
- Khayat, M., Yang, W.J., Aida, K., Nakasawa, H., Tiezt, A., Funkenstein, B., Lubzens, E., 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Panaeus semisulcatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 110, 307-318.
- Knowles, F.G.W., 1953. Endocrine activity in the crustacean nervous system. Proc. R. Soc. Lond. Biol., 141, 248-267.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991(a). Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp. Biochem. Physiol. 100A (3), 599-602.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991(b). Effect of composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp. Biochem. Physiol. 99 A, 215-218.

- Kummer, G., Keller, R., 1993. High-affinity Binding of Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) to Hepatopancreatic Plasma Membranes of the Crab *Carcinus maenas* and the Crayfish *Orconectes limosus*. *Peptides* 14, 103-108.
- Kuo, C.M., Yang, Y.H., 1999. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Comp. Physiol. B* 169, 49-54.
- Le Roux, A. 1968. Description d'organes mandibulaires nouveaux chez les Crustacés Décapodes. *CR Hebdomadaires Acad. Sci.* 266, 202-205.
- Lehninger, 2000. *Principles of Biochemistry*. Worth Publinter. 3rd ed.
- Lorenzon, S., Giulianini, P.G., Ferrero, E.A., 1997. Lipopolysaccharide-induced hyperglycemia is mediated by CHH release in crustaceans. *Gen Comp Endocrinol.* 108(3),395-405.
- Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P.G., Mettullo, R., Ferrero, E.A., 2004. Variation of crustacean hyperglycemic hormone (cHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *J. Exp. Biol.* 207, 4205-4213.
- Loret, S.M., 1993. Hemocyte differentiation in the shore crab (*Carcinus maenas*) could be accompanied by loss of glycogenosynthesis capability. *J. Exp. Zool.* 267, 548-555.
- Machado, V.L.A., Wassermann, G.F., Marques, M., 1991. In vitro effect of insulin on the uptake of glucose and α -aminoisobutyric acid in the thyroid gland of the turtle (*Chrysemys dorsibigni*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 82, 8-13.
- Machele, P.R., Khan, A.K., Sarojini, R., Nagabhushanam, R.,1989. Copper and Cadmium induces changes in blood sugar level of crab, *Barytelphusa canicularis*. *Uttar Pradesh J. Zool.* 9, 113-115.
- Mañe-Garzon, F., Del-Cas, E., Spector, B.H., Leymonte, J., 1974. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. *Phycis. Seccion A* 33 (86), 163-171.
- Mizuno, Y., Oomura, Y., 1984. Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of rat: *in vitro*. *Brain. Res.* 307, 109-116.
- Morris, S., Airries, C.N., 1998. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. *S. Afr. Zool.* 33, 87- 106.

Moreno, J.A., 1961. Clima do Rio Grande do Sul. Publicação da Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul. Diretoria de terras e colonização, seção de geografia. Porto Alegre-RS-Brasil.

Munger, R., Templer, E., Jallut, D., Haesler, E., Felber, J. P. (1993). Correlations of glycogen synthase and phosphorylase activities with glycogen concentration in human muscle biopsies. Evidence for a double-feedback mechanism regulating glycogen synthesis and breakdown. *Metabolism: Clinical and Experimental* 42, 36-43.

Nagabhushanam, R., Kulkarni, G.K., 1981. Freshwater palaemonid prawn, *Macrobrachium kistenensis* (Tiwari) – Effect of heavy metal pollutants. *Proc. Indian. Natl. Sci. Acad.* 47, 380-386.

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.

Odum, E.P., 1985. *Ecologia*. Interamericana (ed). Rio de Janeiro

Oliveira, G.T., 1998. Metabolismo de carboidratos em caranguejos *Chasmagnathus granulata*. Alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos a diferentes períodos de anoxia ambiental e de recuperação. Porto Alegre, UFRGS, 1988. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS-Brasil.

Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M., 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.* 139, 335-342.

Ollivaux, C., Soyeux, D., 2000. Dynamics of biosynthesis and release of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the X-organ-sinus gland complex of the crayfish *Orconectes limosus*. *Eur. J. Biochem.* 267, 5106-5114.

Parvathy, K., 1972. Endocrine regulation of carbohydrate metabolism during the moult cycle in crustaceans. I. Effect of eyestalk removal in *Ocypode platytarsis*. *Mar. Biol.* 14, 58-62.

Passano, L.M., 1951. The X organ-sinus gland neurosecretory system in crabs. *Anat. Rec.* 111, 502.

- Ramamurthi, R., Mumbach, M., Scheer, B., 1968. Endocrine control of glycogen synthesis in crabs. *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 311-319.
- Reddy, P.S., Bhagyalakshmi, A., 1994. Change in the oxidative metabolism in selected tissues of the crab *Scylla serrata* in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 29, 255-264.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soye, C., Van Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 249, 181-198.
- Rossi, I.C.C., 1992. Estudo da regulação do metabolismo do glicogênio no hepatopâncreas, no diafragma e no manto do gastrópoda pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongus* (Becquaert, 1948). Porto Alegre: UFRGS, 1992. Dissertação (Tese de Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS-Brasil.
- Russel, E.L., Storey, K.B., 1995. Regulation of enzymes of carbohydrate metabolism during anoxia in the salt marsh bivalve *Geukensia demissus*. *Physiol. Zool.* 68, 567-582.
- Saller, C.F., Chiodo, L.A., 1980. Glucose suppresses basal firing and haloperidol-induced increases in the firing rate of central dopaminergic neurons. *Science* 210, 269-271.
- Santiago, P.A., Santiago, D., Block, A. McB., Sagardia, F., 1974. Kinetics of glycogen phosphorylase a from the muscle of blue crab, *Callinectes danae*. *Archs. Biochem. Biophys.* 163, 688-698.
- Santos, E.A., Colares, E.P., 1986. Blood glucose regulation in an intertidal crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 83A (4), 673-675.
- Santos, E.A., Keller, R., 1993 (a). Effect of exposition to atmospheric air on blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (2), 343-347.
- Santos, E.A., Keller, R., 1993 (b). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: current perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (3), 405-411.

- Santos, E.A., Keller, R., 1993 (c). Regulation of circulating levels of the crustacean hyperglycemic hormone – evidence for a dual feedback control system. *J. Comp. Physiol. B* 163, 374-379.
- Santos, E.A., Nery, L.E.M., Keller, R., Gonçalves, A.A., 1997. Evidence for the Involvement of the Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Regulation of Lipid Metabolism. *Physiol. Zool.* 70 (4), 415-420.
- Santos, E.A., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A (3), 329-332.
- Santos, E.A., Stefanello, T.M., 1991. The hemolymph of *Chasmagnathus granulata* ,Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) as a target tissue of the crustacean hyperglycaemic hormone. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24 (3), 267-270.
- Scapin, S., Di Giuseppe, G., 1994. Seasonal variations of glycogen synthase and phosphorylase activities in the liver of frog *Rana esculenta*. *Comp. Biochem. Physiol.* 107B (2), 189-195.
- Scheer, B.T., Scheer, M.A.R., 1951. Blood sugar in spiny lobsters. Part I of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. *Physiol. Comp. Oecol.* 2, 198-209.
- Schein, V., 1999. Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Porto Alegre: UFRGS, 1999. Dissertação (Tese de Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS-Brasil.
- Schwabe, C.W., Scheer, B.T., Scheer, M.A.R., 1952. The moult cycle in *Panulirus japonicus*. Part II of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans. *Physiol. Comp. Oecol.* 2, 310-320.
- Sedlemeier, D. (1982) The mode of action of the crustacean hyperglycemic neurosecretory hormone (CHH).II. Involvement of glicogen sinthetase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47, 426-432.
- Sedlemeier, D., Keller, R. 1981. The mode of action of the crustacean neurosecretory hyperglycaemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45, 82-90.

- Sedlmeier, D., 1987. The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A, 423-425.
- Sefiani, M., Le Caer, J.P., Soyez, D., 1996. Characterization of hyperglycemic and molt-inhibiting activity from sinus glands of the penaeid shrimp *Panaeus vannamei*. *Gen. Comp. Physiol.* 103 (1), 41-53.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyez, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujouart, F., Spanings-Pierrot, C., 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycaemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *J. Exp. Biol.* 206, 979-988.
- Smullen, R.P., David, J.A., Pitman, R.M., 1996. Endocrine regulation of the phosphatidylinositol pathway in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus* and the shore crab *Carcinus maenas*. *Gen. Comp. Physiol.* 104, 84-91.
- Soyez, D., 1997. Occurrence and diversity of neuropeptides from the crustacean hyperglycemic hormone family in arthropods. A short review. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* Apr24; 814, 319-323.
- Stentiford, G.D., Chang, E.S., Chang, S.A., Neil, D.M., 2001. Carbohydrate Dynamics and the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH): Effects of Parasitic Infection in Norway Lobsters (*Nephrops norvegicus*). *Gen. Comp. Endocrin.* 121, 13-22.
- Telford, M., 1975. Blood glucose in crayfish. III. The source of glucose and role of the eyestalk factor in hyperglycemia of *Cambarus robustus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 51, 69-73.
- Toullec, J.Y., Dauphin- Villemant, C., 1994. Dissociated cell suspension of *Carcinus maenas* Y-organs as a tool to study ecdysteroid production and its regulation. *Experientia* 50, 153-158.
- Tromba, C., Salvaggio, A., Racagni, G., Volterra, A., 1994. Hippocampal hypoglycaemia-activated K⁺ channels: single-channel analysis of glucose and voltage dependence. *Plügers Arch.* 429, 58-63.
- Turcato, G.S., 1990. Estudo bioecológico do caranguejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS, 1990. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas-Zoologia) Instituto de Biociências; Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Udomkit, A., Treerattrakool, S., Panyim, S., 2004. Crustacean hyperglycaemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 298, 79-91.
- Van Handel, E. 1965. Estimulation of glycogen in small amounts of tissue. *Analyt. Biochem.* 11, 256-265.
- Veldhuijzen, J.P., 1975. Effectes of different kinds of food, starvation and restard of feeding on the hemolymph-glucose of the pond snail *Limnaea stagnalis*. *Nth. J. Zool.* Vol 25: 89-102.
- Veldhuijzen, J.P., Beek, G., 1976. The influence of starvation and increased carbohydrate intake on the polyssacaride contents of varius body parts of pond snail *Limnaea stagnalis*. *Nth. J. Zool.* Vol 25:106-118.
- Vinagre, A.S. 1999. Metabolismo de Carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: Efeito do jejum e da realimentação e da apedunculação sobre a adaptação ao estresse hiposmótico. Porto Alegre: UFRGS 1999. Dissertação (Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS-Brasil.
- Vinagre, A.S., Da Silva, R.S.M., 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crab previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Com. Biochem. Physiol.* 102 (3), 579-583.
- Watts, A.E., Hicks, G.A., Henderson, G., 1995. Putative pre-and postsynaptic ATP-sensitive potassium channels in the rat substantia nigra *in vitro*. *J. Neurosci.* 15, 3065-3074.
- Webster, S.G, 1993. High affinity binding of putative moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to membrane bound receptors on the Y-Organ of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 251, 53-59.
- Webster, S.G., Keller, R., 1986. Purification, characterisation and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Comp. Physiol. B*, 156, 617-624.
- Welsh, J.H., 1941. The sinus gland and 24-hour cycles of retinal pigment migration in the crayfish. *J. Exp. Zool.* 86, 35-49.

Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T., Naya, Y., 1994. Characterization of crustacean hyperglycaemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by stereoinversion and diverse functions. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 387-398.}

ANEXO

Guide for Authors

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

Aims and scope of CBP

The journal publishes original articles emphasizing comparative and environmental aspects of the physiology, biochemistry, molecular biology, pharmacology, toxicology and endocrinology of animals. Adaptation and evolution as organizing principles are encouraged. Studies on other organisms will be considered if approached in a comparative context.

Part A. Molecular and Integrative Physiology deals with molecular, cellular, integrative, and ecological physiology. Topics include bioenergetics, circulation, development, excretion, ion regulation, endocrinology, neurobiology, nutrition, respiration, and thermal biology. Studies on regulatory mechanisms at any level or organization such as signal transduction and cellular interactions and control of behaviour are encouraged.

Part B. Biochemistry and Molecular Biology covers biochemical and molecular biological aspects of metabolism, enzymology, regulation, nutrition, signal transduction, promoters, gene structure and regulation, metabolite and cell constituents, macromolecular structures, adaptational mechanisms and evolutionary principles.

Part C. Toxicology and Pharmacology is concerned with chemical and drug action at different levels of organization, biotransformation of xenobiotics, mechanisms of toxicity, including reactive oxygen species and carcinogenesis, endocrine disruptors, natural products chemistry, and signal transduction. A molecular approach to these fields is encouraged.

Naturally, a certain degree of overlap exists between the different sections, and the final decision as to where a particular manuscript will be published after passing the rigorous review process lies with the editorial office.

Submission and review of manuscripts

All manuscripts (one original plus three copies) must be submitted to the editors:
The Editors, CBP Editorial Office, University of British Columbia, 1153 -- 2111 Lower Mall, Vancouver BC, Canada V6T 1Z4.

Authors should provide names and addresses (including phone and fax numbers and e-mail address) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as

reviewers. Authors are requested to select an appropriate section and suggest an associate editor of CBP.

Every manuscript is independently reviewed by at least two referees. Rapid turn-around will be encouraged by use of fax and e-mail transmission. Based on these reports, a decision regarding publication, revision or rejection is taken.

Review articles

Before writing their manuscripts, potential authors of review articles should contact one of the Editors who, after consultations with the other editor and/or members of the Editorial Board, will provide feedback on suitability of the topic. Reviews should be topical, and serve as critical appraisals of areas of research. They should provide an up-to-date analysis of concepts and point out future directions. For manuscript preparation, follow the instructions below.

Online submission of papers

Authors are encouraged to submit their manuscripts to the CBP office electronically, by using the EISubmit submission tool at <http://www.elsevier.com/submit/cbpsubmit>. After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process.

Full instructions on how to use the online submission tool are available at the above web address.

Colour: Colour figures are published at the author's expense. However, a limited number of colour illustrations may be included, free of charge, at the discretion of the editors.

Revision of manuscripts: Revised manuscripts must be submitted within two months of the authors' receipt of the referees' reports. Otherwise they will be considered as new submissions.

Proofs: The corresponding author will receive proofs by e-mail or post. Proofs must be checked immediately and returned to Elsevier. Corrections to the proofs should be restricted to printer's errors only. Substantial alterations may be charged to the author. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Reprints: The corresponding author will receive twenty five offprints free of charge. Additional offprints may be purchased using the order form accompanying the proofs.

Page charges: CBP has no page charges.

Preparation of manuscripts

Sections: Manuscripts should be subdivided into the following sections: Title page, abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references, captions to figures, tables.

Format: All sections of the manuscript must be double-spaced with 2.5 cm (1 inch) margins. Pages should be numbered consecutively. Avoid footnotes. Underline only words

or letters that will be printed in italics. Mark the position of each figure and table in the margin. The full Latin name of all species used in the study must be supplied.

Title page: The title should be short, concise and informative. Consult a recent issue of CBP for author format. The author's name should be followed by his/her department, institution, city, and country. Indicate the author to whom correspondence and proofs should be addressed, and supply full postal address as well as phone and fax numbers, and an e-mail address. Please provide a running title of not more than 45 characters. If submitting a review article, write "REVIEW" at the top of the title page.

Abstract: The second page of the manuscript must contain only the abstract and the key words. The abstract should be a single paragraph not exceeding 200 words. Non-standard abbreviations and reference citations should be avoided.

Key words: Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetical order after the abstract. Only these key words, together with the title, will be used to compile the subject index.

References:

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Do not use et al. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc. Follow the relevant examples below.

References to books, book chapters and journals should be as follows:

Axelsson, M., Farrell, A.P., 1993. Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

Am. J. Physiol. 264, R963 - 971.

Bond, C.E., 1979. *Biology of Fishes*. Saunders Publ., Philadelphia, PA.

Bowden, L.A., Rainger, G.E., Holland, J.W., Knight, J., Secombes, C.J., Rowley, A.F., 1997. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 117C, 291 - 298.

Collie, N.L., Ferraris, R.P., 1995. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4. *Metabolic Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 221 - 239.

Tables: Tables should be prepared for direct camera copy or clearly typed as follows: (a) Refer to current tables in the journal, for required spatial layout. If possible, a laser printer with a Times Roman font should be used.

(b) Each table, including heading and legend should be typed on a separate sheet.

(c) Insert heavy rules at the head and foot of each table, and fine rules below column headings.

Italics: Genus and species names, and other words normally italicized, should be typed in italics or underlined. Do not use italics in the references.

Illustrations: Photographs, charts and diagrams are to be referred to as "figs" and should be ordered consecutively.

Computer Disks: CBP uses electronic files for speed and accuracy of production. Authors will receive full instructions on disk types, formatting etc. with the letter of provisional acceptance from the editorial office. If you are not submitting online, please observe the following criteria:

1. Send only hard copies when first submitting your manuscript.
2. The electronic file should include all textual material (text, references, tables, figure captions, etc.). Use separate illustration files, if available.
3. The file should use the wrap-around end-of-the-line feature, i.e., returns at the end of paragraphs only. Place two returns after every element such as title headings, and paragraphs.
4. Make sure the disk does not contain a virus.
5. Keep a back-up disk for reference and safety.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Science K.K. will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo Office: Elsevier Science K.K., 9-15 Higashi-Azabu 1-chrome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan. Tel.: +81-3-55615032; Fax: +81-3-55615045; e-mail: info@elsevier.co.jp

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048**), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Summary of requirements

1. Submit four (4) copies of the manuscript - one containing the original artwork, plus three copies. Reduce volume by using two-sided print for the three copies. Suggest the appropriate section of CBP and associate editor.
2. Double-space everything everywhere, leaving 1 inch (2.5 cm) margins.
3. Designate the corresponding author and provide telephone and fax numbers, and an e-mail address.
4. Include a running title of less than 45 letters and spaces.
5. Provide an abstract of less than 200 words; append up to eight key words to the abstract page.
6. Check the style in which references are cited; unpublished work will not be listed in this section unless it is "in press".
7. If referencing manuscripts "in press", enclose two copies each of these manuscripts if considered critical to the refereeing process.
8. Provide names and addresses (including phone and fax numbers & e-mail addresses) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as referees.

Author enquiries

Visit the Author Gateway from Elsevier Science (<http://authors.elsevier.com>) for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. The Author Gateway also provides detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication, by Elsevier.

September 2002 version