

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

**EFEITOS DO ESTRESSE DE MANIPULAÇÃO SOBRE MARCADORES
METABÓLICOS E FISIOLÓGICOS DO CARANGUEJO *Ocypode
quadrata* (CRUSTACEA, OCYPODIDAE)**

Dissertação de Mestrado

ÉVERTON LOPES VOGT

Porto Alegre, 2017

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

**EFEITOS DO ESTRESSE DE MANIPULAÇÃO SOBRE MARCADORES
METABÓLICOS E FISIOLÓGICOS DO CARANGUEJO *Ocypode
quadrata* (CRUSTACEA, OCYPODIDAE)**

ÉVERTON LOPES VOGT

Orientadora: Dra. Anapaula Sommer Vinagre

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, ênfase Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, 2017

Comissão Examinadora

Profª Dra Wania Aparecida Partata
Laboratório de Neurobiologia
Comparada, Departamento de
Fisiologia, UFRGS

Profª Dra. Guendalina Turcato Oliveira,
Laboratório de fisiologia da
Conservação, Departamento de
Ciências Fisiológicas, Faculdade de
Biotecnologia, PUC/RS

Profª Dra Patrícia Pereira
Laboratório de Neurofarmacologia e
Toxicologia Pré-Clínica, Departamento
de Farmacologia, UFRGS

Dedico esse trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr^a Anapaula Sommer Vinagre, pela oportunidade a mim dada e por todo o conhecimento comigo compartilhado.

A todos os professores do LaMEC por suas disponibilidades e incentivo à procura do conhecimento.

A todos os colegas de laboratório, pós-graduandos ou graduandos, por suas amizades e incansáveis horas de trabalho.

Aos professores do curso de Pós-graduação por todo o conhecimento transmitido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro, tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

O caranguejo popularmente chamado de Maria-farinha (ou *Ghost crab*), *Ocypode quadrata*, é encontrado em praias ao longo do Oceano Atlântico ocidental, desde *Rhode Island* (EUA) até o Rio Grande do Sul. Essa espécie tem sido considerada como bioindicadora da saúde de praias arenosas, uma vez que as atividades humanas nas praias causam impacto negativo sobre suas populações. O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos do estresse de manipulação sobre parâmetros metabólicos e fisiológicos. Os caranguejos (47 machos e 19 fêmeas), foram coletados na praia de Quintão (RS). No laboratório, os animais foram mantidos em terrários e alimentados *ad libitum* em dias alternados por um período de aclimação de 15 dias. A salinidade foi mantida em 30‰, a temperatura em 25°C e fotoperíodo natural. Após o período de aclimação, os animais foram acondicionados individualmente e privados de alimentação por três horas. Após isso, os animais eram submetidos, um a um, ao protocolo de estresse de manipulação. Em seguida ao protocolo de estresse de manipulação, os animais foram submetidos a diferentes tempos de recuperação. Após o término da recuperação, foram coletadas amostras de hemolinfa e, logo após, os caranguejos foram crioanestesiados para coleta dos tecidos. O estresse de manipulação de 5 minutos não foi capaz de provocar mudanças significativas em nenhum dos tempos de recuperação (30min e 60min), em variáveis como colesterol e proteínas totais, ambos na hemolinfa, tampouco nas concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e coração, triglicerídeos no hepatopâncreas e lactato muscular. Na hemolinfa, a concentração de triglicerídeos reduziu 30 minutos após a manipulação, a glicemia elevou-se aos 30 e 60 minutos enquanto a concentração de lactato circulante elevou-se imediatamente após a manipulação e diminuiu 60 minutos após. A concentração de glicogênio muscular dos caranguejos aumentou 30 minutos de recuperação. A expressão gênica de CHH e de HSP70 não apresentou diferença significativa após 60min de recuperação do estresse de manipulação em nenhum dos tecidos analisados. Esses resultados sugerem que há gliconeogênese intramuscular utilizando lactato como substrato. Ainda percebe-se um efeito poupador de glicose resultado da utilização desse lactato muscular somado à utilização dos triglicerídeos da hemolinfa, priorizando a glicose hemolinfática para o funcionamento do sistema nervoso central do animal. Novas investigações no que concerne ao destino do lactato formado durante trabalho muscular intenso com maiores tempos de recuperação são necessárias, bem como a expressão tanto de CHH e HSP70 nestas novas condições.

ABSTRACT

The Ghost crab *Ocypode quadrata*, found in sandy beaches along the western Atlantic Ocean, from Rhode Island (USA) to Rio Grande do Sul, has been considered a potential bioindicator of health of sandy beaches because human activities on the beaches cause negative impact on its populations. The present work aims to evaluate the effects of handling stress on metabolic and physiological parameters of this crab. The crabs (47 males and 19 females) were collected on Quintão (RS). In the laboratory, the animals were kept in terrariums and fed *ad libitum* every other day during a 15 days acclimation period. The salinity was 30‰, the temperature 25°C and natural photoperiod. After the acclimation period, the animals were individually conditioned and deprived of food for 3 hours. After that, each crab was handled and not allowed to rest for 5 minutes. Following this protocol, the animals were submitted to different recovery times. After the recovery was completed, hemolymph samples were collected and, shortly thereafter, the crabs were cryoanesthetized for tissue collection. The 5-minute handling stress was not able to induce significant changes in any of the recovery times (30min and 60min) in variables such as cholesterol and total proteins, both in hemolymph, nor in glycogen concentrations in the hepatopancreas and heart, triglycerides in the hepatopancreas and muscular lactate. In hemolymph, triglycerides reduced 30 minutes after the manipulation; the glycemia increased at 30 and 60 minutes while the lactate concentration was elevated immediately after the manipulation and decreased 60 minutes after. The muscle glycogen concentration of the crabs increased at 30 minutes. The expression of *CHH* and *HSP70* did not show significant difference after 60min recovery in any of the tissues analyzed. These results suggest that there is intramuscular gluconeogenesis using lactate as the substrate. A glucose-sparing effect is suggested as the sum of muscular gluconeogenesis and the use of hemolymph triglycerides, prioritizing hemolytic glucose for the central nervous system functioning of the animal. New investigations as to the fate of lactate formed during intense muscle work with longer recovery times are required, as well as the expression of both *CHH* and *HSP70* under these new conditions.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF – Apoptosis Inducing Factor
ANOVA – Análise de Variância
cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar
DEPC – Diethyl Pyrocarbonate
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
HCl – Ácido Clorídrico
HSE – Heat Shock Element
HSF1 – Heat Shock Factor 1
HSP – Heat Shock Protein
KOH – Hidróxido de Potássio
LG – Lâmina Ganglionar
ME – Medula Externa
MI – Medula Interna
MT – Medula Terminal
Na₂CO₃ – Carbonato de Sódio
NaF – Fluoreto de Sódio
Na₂SO₄ – Sulfato de Sódio
NO – Nervo Óptico
PCR – Polymerase Chain Reaction
RL10 – Proteína Ribossomal L10
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAm – Ácido Ribonucleico mensageiro
RPM – Rotações por Minuto
SG – Glândula do Seio
XO – Órgão X

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Sistema Órgão-x – Glândula do Seio. Localização do pedúnculo ocular de *Ocypode quadrata*.....4
- Figura 2 – Esquema de como as HSPs são estimuladas por fatores estressores e como sua expressão pode ser alterada.....6
- Figura 3 – Local de coleta do caranguejo *Ocypode quadrata*. Praia de Quintão, município de Palmares do Sul (RS).....9
- Figura 4 – Concentrações de triglicérides na hemolinfa de *Ocypode quadrata* dos grupos controle e estressados por 5 minutos imediatamente, 30 minutos e 60 minutos após a manipulação.....16
- Figura 5 – Concentrações de glicose na hemolinfa de *Ocypode quadrata* dos grupos controle e estressados por 5 minutos imediatamente, 30 minutos e 60 minutos após a manipulação.....17
- Figura 6 – Concentrações de lactato na hemolinfa de *Ocypode quadrata* dos grupos controle e estressados por 5 minutos imediatamente, 30 minutos e 60 minutos após a manipulação.....18
- Figura 7 – Concentrações de glicogênio no músculo da pata de *Ocypode quadrata* dos grupos controle e estressados por 5 minutos imediatamente, 30 minutos e 60 minutos após a manipulação.....19
- Figura 8 – Expressão gênica do Hormônio Hiperglicemiante de Crustáceos (CHH) nos pedúnculos oculares de *Ocypode quadrata* 60 minutos após estresse de manipulação.....20
- Figura 9 – Expressão gênica da proteína de choque térmico HSP70 nos pedúnculos oculares, músculo da pata e hepatopâncreas de *Ocypode quadrata* 60 minutos após estresse de manipulação.....21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos *primers* utilizados nas reações de qRT-PCR.....14

Tabela 2 – Concentrações de colesterol e proteínas totais hemolinfáticas, de glicogênio no hepatopâncreas e coração, triglicerídeos no hepatopâncreas e lactato muscular.....15

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	8
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	9
3.1	Animais.....	9
3.2	Procedimentos Experimentais.....	10
3.3	Protocolo de Manipulação.....	10
3.4	Determinações Bioquímicas.....	10
3.4.1	Concentração de Glicogênio nos tecidos.....	10
3.4.2	Concentração de Metabólitos Hemolinfáticos.....	11
3.4.3	Concentração de Triglicérides no Hepatopâncreas.....	12
3.4.4	Concentração de Lactato Muscular.....	12
3.4.5	Extração e Quantificação de RNA.....	12
3.4.6	Síntese de cDNA.....	13
3.4.7	Expressão dos genes <i>CHH</i> , <i>HSP70</i> e <i>RL10</i>	13
3.5	Análises Estatísticas.....	14
4.	RESULTADOS.....	15
5.	DISCUSSÃO.....	22
6.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	25
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

O caranguejo popularmente chamado de Maria-farinha (ou *Ghost crab*), *Ocypode quadrata*, é o crustáceo mais notável das praias arenosas. A espécie ocorre tipicamente no médio e supralitoral do ecossistema de praias arenosas e sua distribuição geográfica se estende ao longo do Oceano Atlântico ocidental, desde Rhode Island (EUA) até o Rio Grande do Sul (ANTUNES et al., 2010; NEGREIROS-FRANSOZO; FRANSOZO; BERTINI, 2002). Essa espécie de caranguejo tem sido considerada como bioindicadora da saúde de praias arenosas, uma vez que as atividades humanas nas praias causam impacto negativo sobre suas populações (ANTUNES et al., 2010; NEVES; BEMVENUTI, 2006; POMBO; TURRA, 2013). Exemplos dessas atividades nas praias são as pescas artesanal e profissional, o trânsito de automóveis, a presença de grande população humana nos meses de verão e a proliferação de lixo e restos de alimentos. A análise do impacto da ação antropogênica sobre as populações de *O. quadrata* tem sido realizada pelo método da contagem de tocas em quadrantes nas praias (BLANKENSTEYN, 2006; HOBBS; LANDRY; PERRY, 2008; NEVES; BEMVENUTI, 2006; POMBO; TURRA, 2013; SCHLACHER; THOMPSON; PRICE, 2007). Uma possível causa de estresse antrópico que ainda não foi alvo de estudos científicos é a atividade turística chamada “ghost crabbing”, comum em praias norte americanas, que consiste em passeios noturnos à praia com o objetivo de capturar caranguejos e soltá-los em seguida por simples diversão. Essa atividade não é difundida no Brasil, porém é comum avistarmos pessoas brincando com caranguejos nas praias brasileiras.

A avaliação das variações sazonais no metabolismo energético de *O. quadrata* entre as praias de Siriú (SC) considerada de pouca ação humana (VINAGRE et al., 2006) e a praia de Rondinha (RS), de alta atividade humana (ANTUNES et al., 2010), revelou diferenças entre as duas populações. Antunes et al. (2010) ainda sugerem que essas diferenças possam ser devidas às condições ambientais, assim como a pressão antropogênica.

Tendo em vista que caranguejos do gênero *Ocypode* são considerados notáveis atletas, podendo atingir velocidades de até $4\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ou terem a

capacidade de manter um esforço físico de baixa velocidade por mais de uma hora sem necessitar de repouso (FULL, 1987); o caranguejo *O. quadrata* tem sido estudado como modelo para a fisiologia do exercício em crustáceos (FULL, 1987; PERRY et al., 2009; TULLIS; ANDRUS, 2011; WEINSTEIN, 1995; WEINSTEIN; FULL; AHN, 1994). Quando exercitados em esteiras com velocidades controladas, a concentração de lactato corporal aumenta progressivamente no período de 5 a 20 min, sendo esse aumento proporcional à velocidade aumentando de 0,5 para 15 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ à velocidade de 0,28 km.h^{-1} . (FULL, 1987). O tecido muscular de crustáceos representa grande parte de sua massa total e é constituído por fibras com grande diversidade de características morfofisiológicas. Fibras musculares com diferentes velocidades de contração e tamanhos dos sarcômeros e atividade de enzimas oxidativas (PERRY et al., 2009), o que pode implicar em diferenças na produção e acúmulo de metabólitos intracelulares e um consequente desequilíbrio ácido-básico (HENRY et al., 1994). Por isso, a diferença no tipo de fibras musculares dessa espécie parece influenciar diretamente no seu metabolismo para produção de energia.

Em crustáceos, alterações em variáveis relacionadas ao metabolismo energético são necessárias para satisfazer a demanda imposta por estresse, de qualquer natureza. Tais alterações são coordenadas por mecanismos neuroendócrinos que apresentam algumas semelhanças e diferenças em relação aos vertebrados (KUO; YANG, 1999; LORENZON, 2005).

Em vertebrados, a resposta primária ao estresse é caracterizada pela elevação nos níveis de catecolaminas e dos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e um dos efeitos da elevação destes hormônios é a hiperglicemia, considerada como uma resposta secundária ao estresse (APARICIO-SIMÓN et al., 2010; KUO; YANG, 1999). A elevação nos níveis de catecolaminas seguida por elevação na glicemia também foi descrita quando algumas espécies de crustáceos foram expostas a agentes estressores (APARICIO-SIMÓN et al., 2010; KUO; YANG, 1999). Estas elevações nas catecolaminas foram seguidas por elevações nos níveis de glicose e de lactato na hemolinfa de camarões *Litopenaeus vannamei*, como descrito por Aparicio-Simón et al. (2010). Desta forma, assim como em vertebrados, a hiperglicemia

e a hiperlactatemia também podem ser consideradas como resposta secundária ao estresse em crustáceos (APARICIO-SIMÓN et al., 2010; FREDERICH et al., 2009; KUO; YANG, 1999).

A formação do lactato ocorre devido a uma limitação na capacidade oxidativa muscular, ou por dificuldade de difusão através das membranas dos capilares e das células (BENETTI; SANTOS; CARVALHO, 2000). Alguns autores (McDONALD et al., 1979; WOOD; RANDALL, 1981) ainda afirmam que o lactato é o metabólito primário produzido em crustáceos e pode constituir o componente metabólico total na acidose induzida por estresse. Outros estudos (MATSUMASA; MURAI, 2005) ainda afirmam que a concentração de lactato na hemolinfa de crustáceos pode ser uma variável utilizada para estimar as consequências energéticas de atividades de estresse.

Além das catecolaminas, outras monoaminas como a serotonina e a melatonina são distribuídas pelo sistema nervoso dos crustáceos e têm um diversificado leque de efeitos fisiológicos (CHENG; CHIU; YEH, 2006), podendo agir como neuroreguladores (neurotransmissores e neuromoduladores) ou hormônios (ELOFFSON et al., 1982; FINGERMAN; NAGABHUSHNAM, 1992; KUO; YANG, 1999). Alguns estudos em crustáceos descrevem hiperglicemia após injeções de adrenalina, noradrenalina, dopamina, serotonina e melatonina (KUO; YANG, 1999; LÜSCHEN et al., 1993; SAINATH; REDDY, 2010; INOHARA et al., 2015). Como estas moléculas também podem agir como neuromoduladores e estimular a secreção de hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) pelo pedúnculo ocular, alguns autores sugerem que o efeito hiperglicemiante das monoaminas é, na verdade, um efeito indireto, pela ação do CHH (SAINATH; REDDY, 2010). No caranguejo *Neohelice granulata*, a ação hiperglicemiante da serotonina por exemplo, parece ser resultante da ligação desta indoleamina a receptores 5HT_{1-like} e 5HT_{2-like} presentes nas brânquias, hepatopâncreas e músculo, assim como resultante de sua ação moduladora sobre a secreção de CHH (INOHARA et al., 2015).

O CHH talvez represente o mecanismo neuroendócrino mais reconhecido como resposta a estresse em crustáceos (FANJUL-MOLES, 2006; WEBSTER; KELLER; DIRCKSEN, 2012). Esse hormônio é secretado

principalmente pelo sistema Órgão-X – Glândula do Seio, localizado nos pedúnculos oculares de crustáceos decápodes (Figura 1), particularmente em situações de estresse como hipóxia, variações anormais de salinidade e temperatura, infecção ou até mesmo, exercício (CHUNG; ZMORA, 2008; MORRIS et al., 2010; WEBSTER; KELLER; DIRCKSEN, 2012).

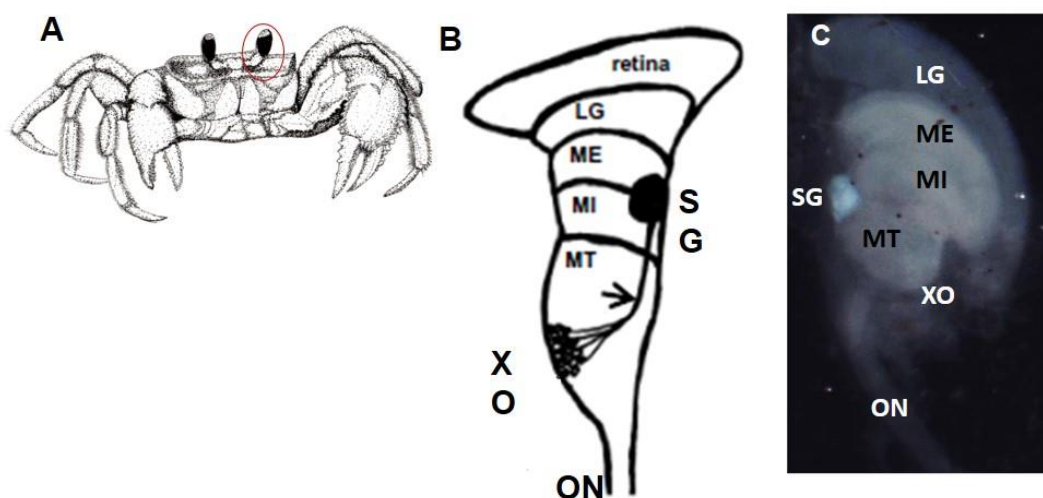


Figura 1: Sistema Órgão-X – Glândula do Seio. A) Localização do pedúnculo ocular de *Ocypode quadrata*. B) Representação esquemática do sistema ganglionar no interior do pedúnculo ocular de *Chionoectes opilio* (CHUNG et al., 2015). C) Fotografia do sistema Órgão X – Glândula do Seio de *O. quadrata* (VINAGRE; CHUNG, 2016). LG: lamina ganglionar, ME: medula externa, MI: medula interna, MT: medula terminal, XO: órgão X, SG: glândula do Seio, NO: nervo óptico.

O CHH é considerado o principal hormônio controlador do metabolismo de carboidratos em crustáceos (FANJUL-MOLES, 2006; WEBSTER; KELLER; DIRCKSEN, 2012). Alguns autores (APARICIO-SIMÓN et al., 2010; INOHARA et al., 2015) compararam o efeito da administração de serotonina, dopamina, adrenalina, noradrenalina e octopamina em crustáceos intactos ou

apendunculados (remoção cirúrgica dos pedúnculos oculares). Todas estas moléculas causaram hiperglicemia nos animais intactos, sendo o efeito da serotonina o mais potente. Entretanto, nos animais apendunculados, apenas a octopamina e a noradrenalina apresentaram efeito hiperglicemiante significativo (KUO; YANG, 1999).

Na década de 60, Ritossa (1962) demonstrou que o estresse térmico é capaz de estimular a expressão de alguns genes em glândulas salivares de *Drosophila melanogaster*. Dessa maneira, foi sintetizada uma classe de proteínas com peso molecular de 70kD. Essas proteínas foram então denominadas proteínas de choque térmico (HSP, do inglês *Heat Shock Proteins*) por serem induzidas pelo choque térmico. Posteriormente ficou evidente que estas proteínas estão envolvidas na resposta a vários tipos de estresse, como infecção por bactérias (LIU et al., 2015), contaminação por metais pesados (MAZZEI et al., 2015), alterações de salinidade (BAO et al., 2014), exercício (FEBBRAIO; KOUKOULAS, 2000), formação de espécies reativas de oxigênio (FITTIPALDI et al., 2014) entre outros (Figura 2).

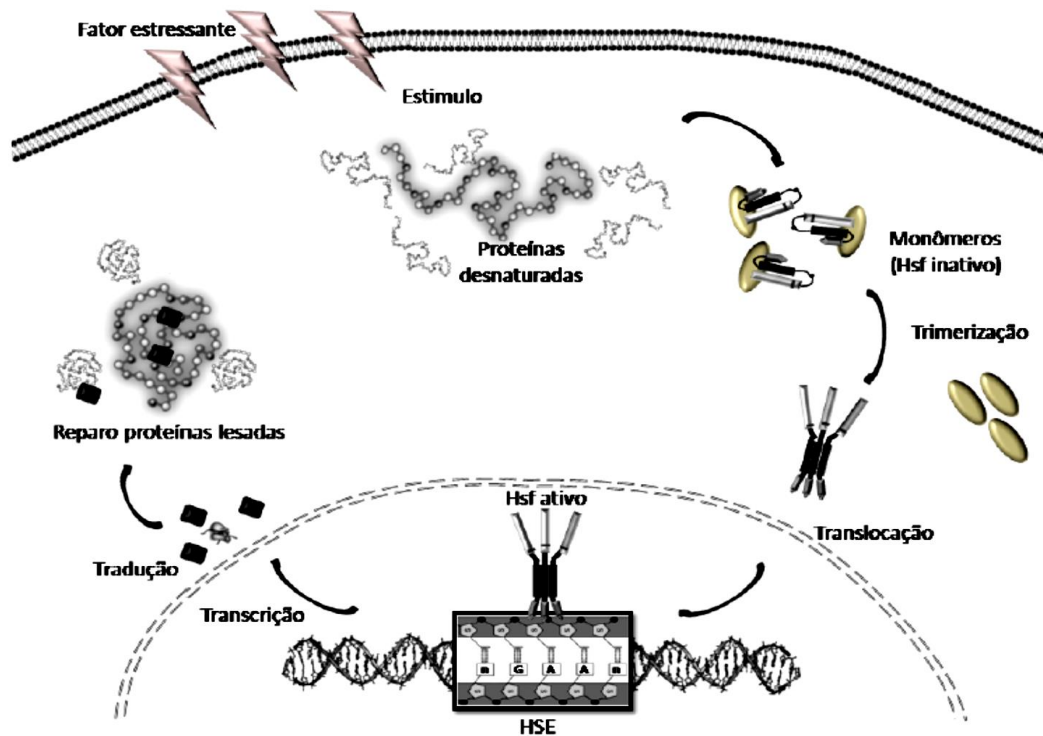


Figura 2. Esquema de como as HSPs (*Heat Shock Proteins*) são estimuladas por fatores estressores e como sua expressão pode ser assim alterada. HSE: *Heat Shock Elements*; Hsf: *Heat Shock Factor* (CASTRO et al., 2013).

As HSPs estão envolvidas em processos essenciais para a função celular como: apresentação de antígeno, ligação ao receptor de esteróides, tráfego intracelular, ligação ao receptor nuclear e apoptose (GRIGORE; INDREI, 2001; YENARI et al., 1999).

A formação de RNAm de HSP70 se dá por meio do desacoplamento da HSP70 celular já formada de um fator chamado HSF1 (*Heat Shock Factor 1*). O HSF1, por sua vez, deve ser fosforilado e trimerizado para que possa entrar no núcleo celular. Já no núcleo celular, o HSF1 se liga aos HSE (*Heat Shock Elements*), que são elementos presentes na zona promotora do gene responsável pela codificação da HSP70, formando assim um RNAm que será posteriormente traduzido no citoplasma celular (CASTRO et al., 2013; PIRKKALA; NYKÄNEN; SISTONEN, 2001).

Em humanos (FEBBRAIO; KOUKOULAS, 2000), há uma expressão aumentada da HSP70 de 160 a 200 minutos após início de exercício de ciclismo, e ainda uma importante função anti-apoptótica e anti-inflamatória destas proteínas (CASTRO et al., 2013).

A HSP70 é capaz de diminuir a permeabilidade da mitocôndria, através da inibição da translocação de proteínas como a Bax, proteína responsável pela formação de poros na mitocôndria resultando na liberação de fatores pró-apoptóticos como citocromo *c* e fator indutor de apoptose (AIF – *Apoptosis Inducing Factor*). Este processo ainda culmina com a ativação de caspases, principais proteínas responsáveis por apoptose (CASTRO et al., 2013).

Contudo, é na biossíntese de proteínas que desempenham sua função mais importante, agindo como chaperonas moleculares, auxiliando polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional correta (BECKER; CRAIG, 1994; FEDER; HOFMANN, 1999; FEDER; PARSELL; LINDQUIST, 1995). Da mesma forma, as HSPs protegem as células da desnaturação e da agregação de polipeptídios induzidos durante o estresse, aumentando as chances de sobrevivência da célula (BECKER; CRAIG, 1994; FEDER; PARSELL; LINDQUIST, 1995; LINDQUIST; CRAIG, 1988; YENARI et al., 1999).

Em crustáceos como a lagosta *Homarus americanus*, por exemplo, o estresse osmótico causou um aumento significativo na expressão de HSP70 e HSP90 no hepatopâncreas e músculo (CHANG, 2005). Nos crustáceos subterrâneos do gênero *Niphargus*, foi identificado um aumento significativo da expressão da HSP70 após elevação de 6°C no meio ambiente por 12h, 1, 2 e 3 meses (COLSON-PROCH et al., 2010). No caranguejo *N. granulata*, Fernandes (2010) verificou que a HSP70 aumenta nas brânquias posteriores de animais submetidos ao estresse osmótico.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse de manipulação sobre marcadores metabólicos e fisiológicos do caranguejo *Ocypode quadrata*.

2.1 Objetivos Específicos

Avaliar, imediatamente após a manipulação e após diferentes tempos de recuperação, as concentrações de:

- Glicose, lactato, triglicerídeos, colesterol total e proteínas totais na hemolinfa;
- Triglicerídeos no hepatopâncreas;
- Glicogênio no músculo do quelípede (pata), hepatopâncreas e coração;
- Lactato no músculo do quelípede (pata);
- A expressão gênica de CHH no pedúnculo ocular e
- expressão gênica de HSP70 no pedúnculo ocular, hepatopâncreas e músculo do quelípede.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados caranguejos *Ocypode quadrata* (Crustacea, Ocypodidae) machos e fêmeas (47 machos e 19 fêmeas). Os animais foram coletados de acordo com as leis ambientais brasileiras (Portaria nº 332/90 IBAMA) na praia de Quintão, Palmares do Sul (RS), coordenadas 30°39' sul e 50°29' oeste (Figura 3) durante os meses de verão, sob a licença 6373962 no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO). A captura foi realizada manualmente e o acondicionamento dos animais foi realizado em recipientes plásticos, com areia do próprio local, até o laboratório, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, em Porto Alegre (RS).

No laboratório, os animais foram mantidos em terrários e alimentados *ad libitum* em dias alternados por um período de aclimação de 15 dias. Foram oferecidos alimentos representativos da dieta natural da espécie: moluscos (lulas) e crustáceos (camarão). A salinidade foi mantida em 30‰, a temperatura em 25°C e fotoperíodo natural.



Figura 3. Local de coleta do caranguejo *O. Quadrata*. Praia de Quintão, Município de Palmares do Sul, RS. Fonte: *GoogleMaps*

3.2 Procedimentos Experimentais

Após o período de aclimatação, os animais foram acondicionados individualmente e privados de alimentação por três horas. Após isso, os animais eram submetidos, um a um, ao protocolo de estresse de manipulação.

Em seguida ao protocolo de estresse de manipulação, os animais foram submetidos a diferentes tempos de recuperação. Após o término da recuperação, foram coletadas amostras de hemolinfa e, logo após, os caranguejos foram crioanestesiados para posterior coleta dos tecidos: pedúnculo ocular, hepatopâncreas, músculo do terceiro pereiópode (pata) e coração.n

3.3 Protocolo de manipulação

Para a realização do protocolo de manipulação, os animais foram colocados, um de cada vez, em outro terrário onde eram estimulados, por perseguição, durante cinco minutos, de maneira que não pudessem permanecer estáticos em nenhuma hipótese.

Após o término dos cinco minutos, os animais foram realocados em suas gaiolas individuais, onde permaneceram por diferentes períodos de recuperação pós-manipulação, tais como 1) 0min: animais que foram submetidos à coleta de hemolinfa logo após a manipulação e crioanestesiados para a coleta de tecidos; 2) 30min: animais que foram submetidos à coleta de hemolinfa trinta minutos após o término da manipulação e crioanestesiados em seguida para a coleta de tecidos; 3) 60min: animais que foram submetidos à coleta de hemolinfa sessenta minutos após o término da manipulação e crioanestesiados em seguida para a coleta de tecidos.

3.4 Determinações Bioquímicas

3.4.1. Concentração de glicogênio nos tecidos

A extração e quantificação de glicogênio dos tecidos foi realizada conforme descrito por (INOHARA et al., 2015). Amostras de tecidos retiradas dos caranguejos foram depositadas em tubos plásticos com capacidade para

15mL contendo 0,5 mL de KOH 30% e submetidas à digestão em banho fervente por 60 minutos. Para a precipitação do glicogênio, foram adicionados aos tubos uma gota de Na₂SO₄ saturado e 1mL de álcool etílico 96% e, em seguida, centrifugadas por dez minutos a 2000RPM. Terminada essa etapa, os tubos foram invertidos para que fosse descartado o sobrenadante. O glicogênio foi ressuspensão com 0,5mL de água destilada e foi adicionado 1mL de álcool etílico 96% para que fosse centrifugado novamente por dez minutos a 2000RPM. Mais uma vez os tubos foram invertidos para o descarte do sobrenadante. Para a hidrólise ácida do glicogênio, este foi novamente ressuspensão com 0,5mL de água destilada. Em novos tubos, essa suspensão foi diluída trinta vezes e foram acrescentados 0,3mL de HCl 4N para novo banho fervente por mais 60 minutos. Após as amostras esfriarem em temperatura ambiente, estas foram neutralizadas com 0,3mL Na₂CO₃ 2M. Após a hidrólise ácida a glicose resultante foi quantificada pelo método enzimático da glicose-oxidase com o *Kit* Glicose Liquiform (Labtest Diagnóstica SA) em 20µL de amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505nm. Uma curva padrão de glicogênio (1mg/mL) foi utilizada como fator de calibração e os resultados foram expressos em miligramas de glicogênio.grama de tecido⁻¹.

3.4.2. Concentração de metabólitos hemolinfáticos

As amostras de hemolinfa foram preparadas para processamento através de centrifugação por cinco minutos a 3000RPM. As concentrações de substratos hemolinfáticos, como glicose, lactato, proteínas totais, colesterol e triglicerídeos, foram quantificadas por métodos enzimáticos com *kits* comerciais (Labtest Diagnóstica SA) em 20µL de amostra. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimentos de ondas específicos para cada substrato: 1) glicose e triglicerídeos: 505nm; 2) lactato: 550nm; 3) proteínas totais: 545nm; 4) colesterol: 500nm. Os resultados de glicose, triglicerídeos, lactato e colesterol foram expressos em miligramas.decilitros⁻¹ de hemolinfa e os de proteínas totais, gramas.decilitro⁻¹ de hemolinfa.

3.4.3. Concentração de triglicerídeos no hepatopâncreas

As amostras de hepatopâncreas foram depositadas em tubos plásticos e homogeneizadas com salina 0,9% na proporção de 10:1 (1mg de tecido para 10µL de salina). Foram utilizados 10µL desta suspensão para posterior incubação em banho-maria por 10 minutos a 37°C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em miligramas de triglicerídeo.grama de tecido⁻¹.

3.4.4. Concentração de lactato muscular

A extração e quantificação de lactato muscular foi realizada conforme descrito por (SOUZA et al., 2013). Tubos plásticos foram previamente preparados com adição de 1mL de NaF 0,1M, vertidos para descarte da solução e submetidos a quinze minutos de estufa a 50°C para secagem. As amostras de músculo dos animais foram depositadas nestes tubos e homogeneizadas com 1mL de salina 0,9%. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente e centrifugados a 2500g por dez minutos a 4°C. O lactato foi dosado pelo método enzimático com *Kit* Lactato Liquiform (Labtest Diagnóstica SA) em 10µL de amostra do sobrenadante. A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. Os resultados foram expressos em miligramas de lactato.grama de tecido⁻¹.

3.4.5. Extração e quantificação de RNA

A extração de RNA das amostras seguiu a metodologia descrita por (VINAGRE; CHUNG, 2016). Os tecidos (pedúnculo ocular, músculo da pata e hepatopâncreas) extraídos dos caranguejos foram depositados em tubos plásticos previamente esterilizados, estocados imediatamente em freezer (-80°C) e lá mantidos até o momento de sua utilização para extração do RNA. Após homogeneização dos tecidos com 1mL de TRIZOL, foi acrescentado 0,2mL de clorofórmio. Em seguida, os tubos foram centrifugados por dez minutos a 12000RPM e 4°C. Foi aliquotado 0,5mL da fase superior aquosa e transferido para novos tubos plásticos esterilizados. Depois disso,

acrescentado 1mL de álcool isopropílico nos tubos para incubação de doze horas a -20°C. Em seguida os tubos foram centrifugados por dez minutos a 12000RPM e 4°C. O sobrenadante foi descartado para que restasse apenas o precipitado de RNA. Foi adicionado 1mL de álcool etílico 75% diluído em água DEPC. Depois disso, os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 7500RPM e 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram secos em temperatura ambiente para que o álcool etílico evaporasse. O precipitado restante foi ressuspensão com 0,05mL de água DEPC e aquecido por 5 minutos a 60°C. Para a quantificação do RNA, uma alíquota de 2µL da solução de RNA de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (GE Healthcare NanoVue Plus), nos comprimentos de onda de 260nm e 280nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão entre absorvâncias de 260nm e 280nm se manteve no intervalo de 1,6 a 2,1. Para a síntese de cDNA, foi utilizado 1µg de RNA total.

3.4.6. Síntese de cDNA

Na etapa de eliminação do DNA genômico, foi utilizado 1µg de RNA total, ao qual foram adicionados 2µL de 5x gDNAeracer Buffer, 1µL de gDNAeracer e água RNAase, se necessário (*Takara - PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser – Perfect Real Time*). O volume final de cada tubo foi de 10µL. Essa solução foi submetida a um tratamento de dois minutos a 42°C (VINAGRE; CHUNG, 2016). Na etapa da transcrição reversa, à solução acima citada, foram adicionados 4µL de tampão 5x *PrimeScript 2*, 1µL de *PrimeScript RT Enzyme Mix*, 1µL de *RT Primer Mix* e 4µL de água RNAase (*Takara - PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser – Perfect Real Time*). O volume final de cada tubo foi de 20µL. Essa solução foi submetida a um tratamento de quinze minutos a 37°C, seguidos de cinco segundos a 85°C.

3.4.7. Expressão dos genes *CHH*, *HSP70* e *RL10*

A expressão dos genes foi realizada conforme metodologia descrita por (VINAGRE; CHUNG, 2016). Para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 1µL de cDNA, com uma concentração de aproximadamente 400ng.µl⁻¹, foi

utilizado como molde em uma mistura de reação contendo 5µL de *Fast Sybr Green Master Mix* (Applied Biosystems), 1µL de *Primer Mix* específica para cada gene (Tabela X) e 5µL de água esterilizada (volume final 12µL). Para posterior normalização dos resultados, foi utilizado o gene de controle endógeno *RL10 (Ribossomal Protein 10)*. As amplificações foram realizadas em termociclador Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System.

Tabela 1: Sequências dos *primers* utilizados na reação de qRT-PCR

Sequências dos <i>primers</i> (5' – 3')	
HSP70 F1	TCACTGTACCGGCCTACTTCA
HSP70 R1	AGATCGAAGATGAGCACGTTG
CHH F1	CCTCTTCAGCAAACCTGGAACACGTTTG
CHH R1	AGGTTGCTGTAGCAGTTTGACCTG
RL10 F1	ACGTGCGGGTGCGCCTTCACCCATTCAACG
RL10 R1	GCGAGAGACGTAAATCTTCTGCCGGCCAGGG

cDNA HSP70: GenBank KU613078.1; cDNA CHH: GenBank KM052164;
cDNA RL10: GenBank JX894250.1

3.5 Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como médias mais ou menos o erro padrão (Média ± EPM). Antes de aplicar a análise de variância de duas vias (ANOVA), a homogeneidade dos dados foi testada com o teste de Levene. Os dados que não apresentaram as exigências para a ANOVA foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. A expressão dos genes *RL10*, *CHH* e *HSP70* foi comparada através de teste t não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

O estresse de manipulação de 5 minutos não foi capaz de provocar mudanças significativas em nenhum dos tempos de recuperação (0min, 30min e 60min), em variáveis como colesterol e proteínas totais, ambos na hemolinfa, tampouco nas concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e coração, triglicerídeos no hepatopâncreas e lactato muscular, conforme tabela 1.

Tabela 2: Valores referentes aos tempos de recuperação após o protocolo de estresse de manipulação de 5 minutos: Imediato, 30min e 60min. Concentrações hemolinfáticas de colesterol e proteínas totais e concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e coração, triglicerídeos no hepatopâncreas e lactato muscular.

	Imediato		30min Rec		60min Rec	
	Controle	Stress	Controle	Stress	Controle	Stress
Colesterol Hemolinfa (mg/dL)	15,87 ± 3,35	14,76 ± 2,16	18,52 ± 1,74	18,99 ± 2,71	14,17 ± 1,70	15,29 ± 1,75
Proteínas Totais Hemolinfa (g/dL)	3,44 ± 0,40	3,03 ± 0,39	3,35 ± 0,23	3,21 ± 0,26	3,35 ± 0,36	2,95 ± 0,25
Glicogênio Hepatopâncreas (mg/g de tecido)	0,21 ± 0,04	0,17 ± 0,05	0,20 ± 0,03	0,35 ± 0,15	1,32 ± 0,57	0,21 ± 0,06
Glicogênio Coração (mg/g de tecido)	3,42 ± 1,95	4,96 ± 2,53	11,42 ± 5,17	2,09 ± 0,41	7,27 ± 2,75	6,29 ± 3,47
Triglicerídeos Hepatopâncreas (mg/g de tecido)	55,32 ± 6,93	46,10 ± 10,13	90,84 ± 11,21	97,99 ± 10,46	92,71 ± 14,03	69,75 ± 17,34
Lactato Muscular (mg/g de tecido)	2,94 ± 0,87	3,03 ± 0,83	2,04 ± 0,66	2,32 ± 0,26	3,31 ± 0,50	1,67 ± 0,26

A concentração de triglicerídeos na hemolinfa (figura 4) foi alterada significativamente em diferentes tempos de recuperação após o protocolo de estresse de manipulação ($p < 0,05$).

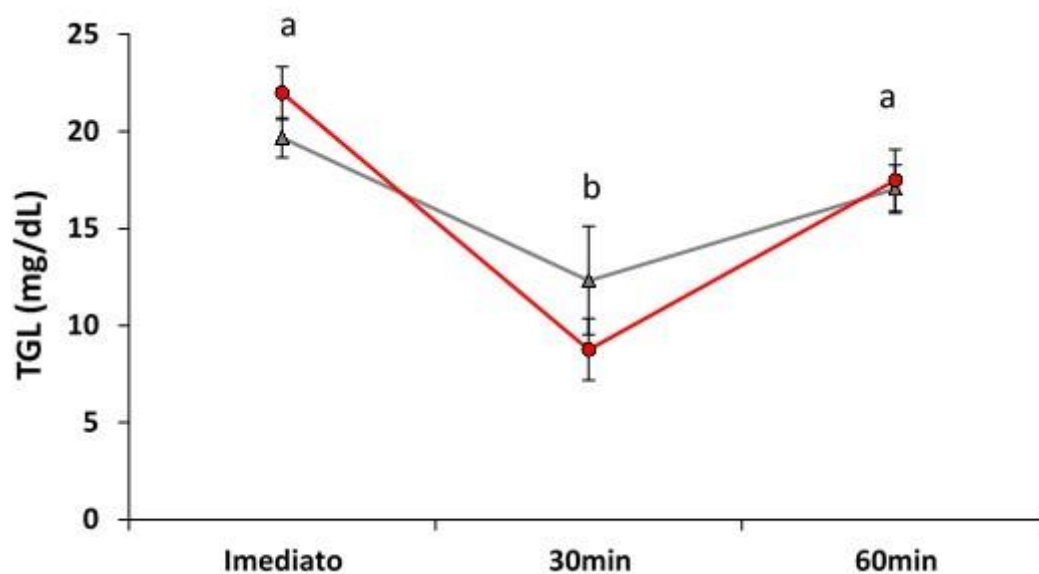


Figura 4. Concentração de triglicerídeos na hemolinfa de caranguejos *O. quadrata* controle (▲) e estressados por 5 minutos (●) imediatamente, 30 e 60 minutos após a manipulação. Letras: diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

A figura 4 mostra que não houve diferença significativa entre grupos experimentais e controles, entretanto apresenta diferenças significativas entre os grupos imediato e 60min (a) e o grupo 30min (b), que foi significativamente menor.

A concentração de glicose hemolinfática (Figura 5) apresentou diferenças significativas tanto entre os diferentes tempos de recuperação do estresse de manipulação ($p < 0,05$), bem como entre os grupos experimentais aos 60min ($p < 0,05$).

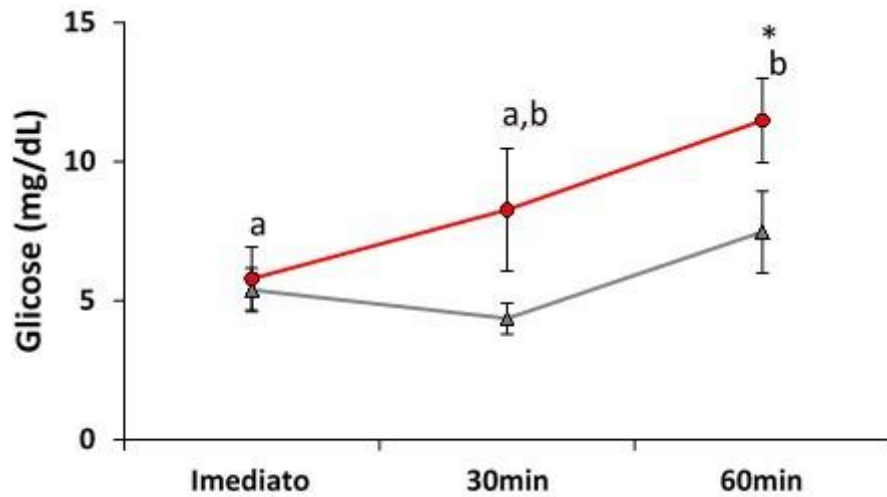


Figura 5. Concentração de glicose na hemolinfa de caranguejos *O. quadrata* controle (▲) e estressados por 5 minutos (●) imediatamente, 30 e 60 minutos após a manipulação. Letras: diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$). *: Diferença significativa entre os tratamentos aos 60 minutos de recuperação ($p < 0,05$).

A concentração de lactato na hemolinfa (figura 6) dos caranguejos estressados apresentou valores iniciais significativamente elevados ($p < 0,05$) em relação aos controles e permaneceu elevada até 30 min após a manipulação, diminuindo significativamente somente aos 60 min.

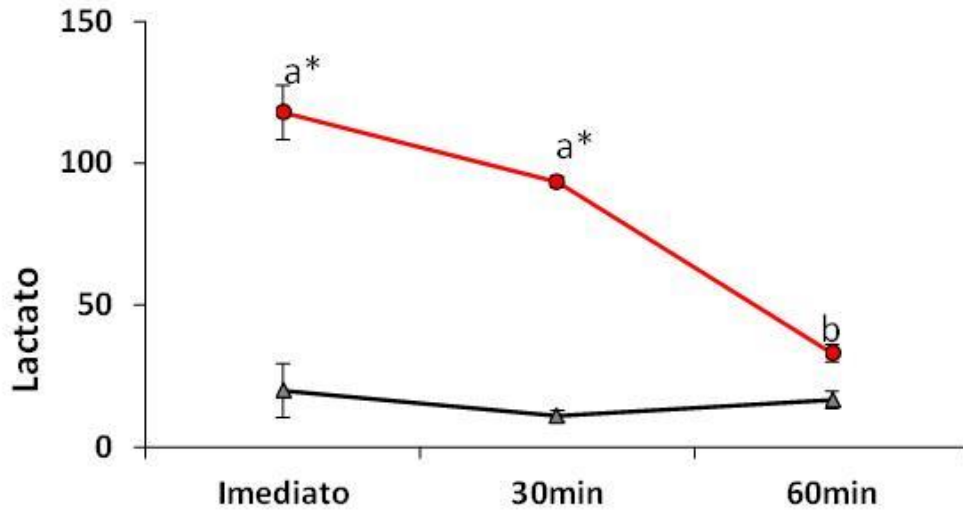


Figura 6. Concentração de lactato na hemolinfa de caranguejos *O. quadrata* controle (▲) e estressados por 5 minutos (●) imediatamente, 30 e 60 minutos após a manipulação. Letras: diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$). *: Diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

A concentração de glicogênio muscular (Figura 7) dos caranguejos apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas entre os tempos de recuperação do estresse de manipulação, aumentando aos 30 minutos de recuperação.

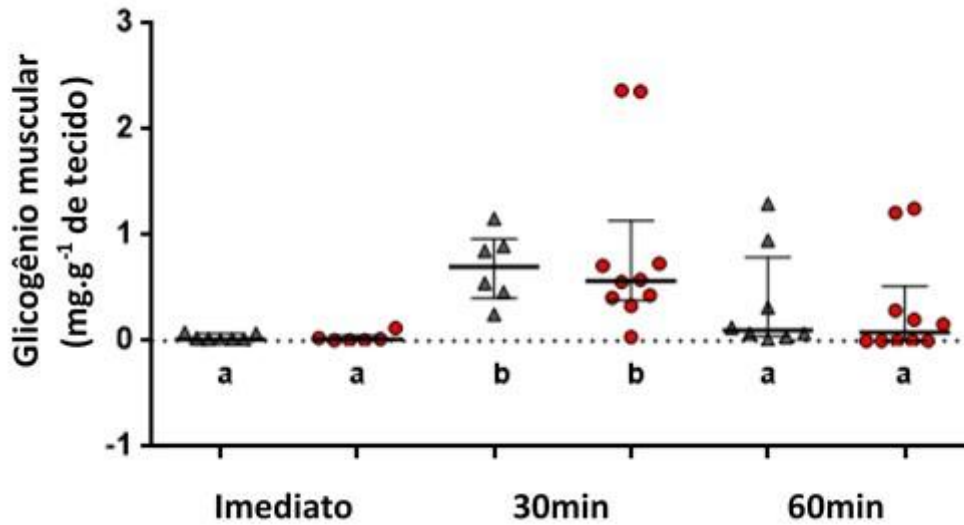


Figura 7. Concentração de glicogênio muscular em caranguejos *O. quadrata* controle (▲) e estressados por 5 minutos (●) imediatamente, 30 e 60 minutos após a manipulação. Letras: diferenças significativas entre os tempos ($p < 0,05$).

A expressão gênica do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) nos pedúnculos oculares (Figura 8), normalizada em relação ao gene *RL10*, 60 minutos após a manipulação, não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$, teste *t* não pareado) entre os dois tratamentos.

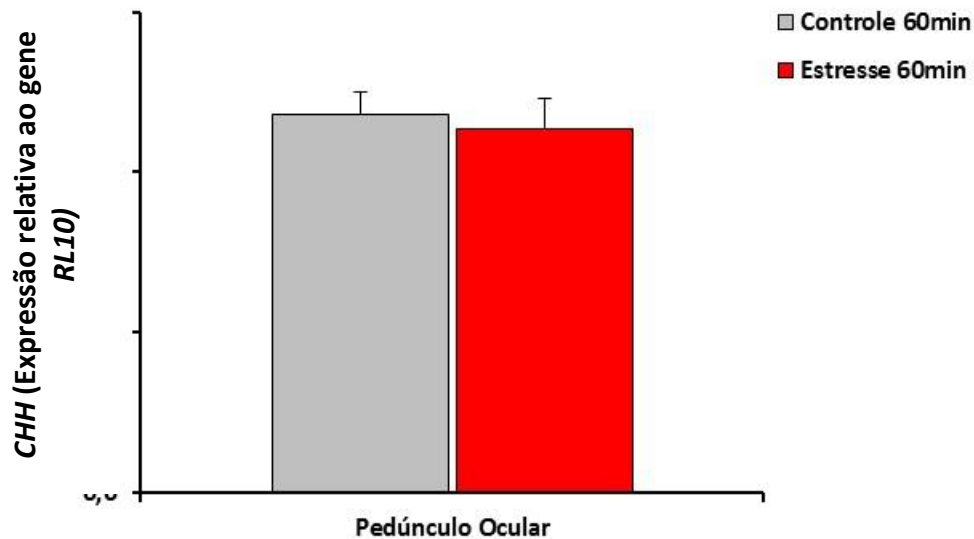


Figura 8. Expressão gênica do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) nos pedúnculos oculares de caranguejos *O. quadrata* 60 minutos após a manipulação. Dados foram normalizados pela expressão da proteína ribossomal L10 (RL10).

A expressão gênica da HSP70 (Figura 9) também não apresentou diferença significativa após 60min de recuperação do estresse de manipulação em nenhum dos tecidos analisados: pedúnculo ocular, músculo e hepatopâncreas.

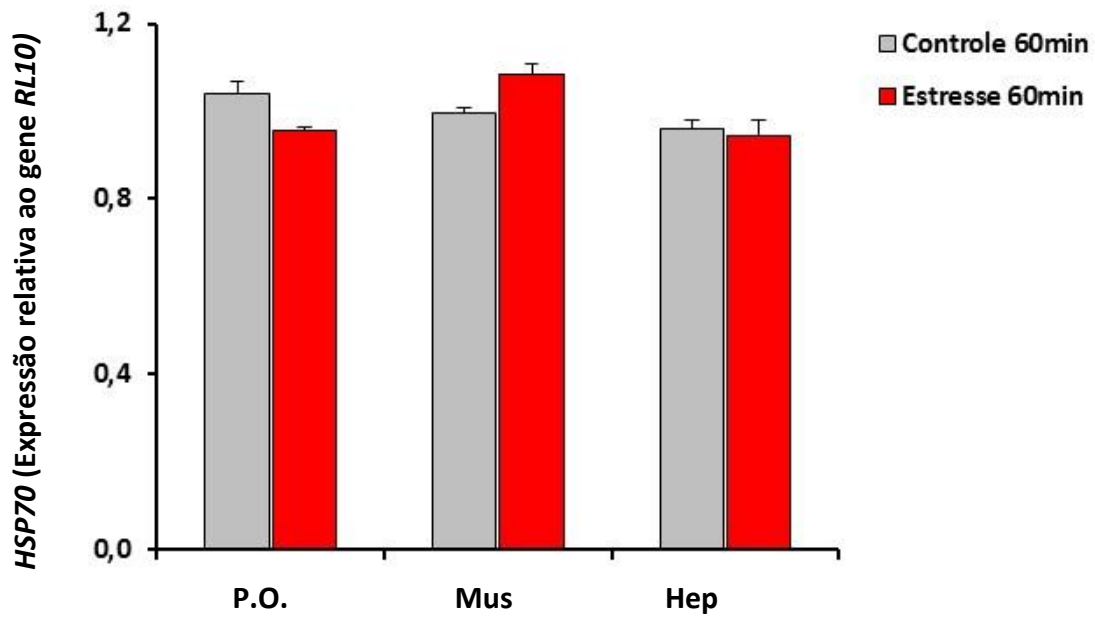


Figura 9. Expressão gênica da proteína de choque térmico HSP70 nos pedúnculos oculares (PO), músculo (Mus) e hepatopâncreas (Hep) de caranguejos *O. quadrata* 60 minutos após a manipulação. Dados foram normalizados pela expressão da proteína ribossomal L10 (RL10).

5. DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de um estresse de manipulação de 5 minutos sobre variáveis metabólicas e fisiológicas como concentração de glicose, colesterol, triglicerídeos, proteínas totais e lactato na hemolinfa do caranguejo *Ocypode quadrata*, bem como a expressão do Hormônio Hiperglicemiante de Crustáceos (CHH) no seu pedúnculo ocular e da proteína de choque térmico HSP70 no pedúnculo ocular, hepatopâncreas e músculo da pata.

Assim como já descrito em vertebrados, durante o exercício, os níveis de lactato na hemolinfa de crustáceos aumenta, como nos caranguejos australianos *Gecarcoidea natalis* e *Discoplax celeste*, por exemplo (MORRIS et al., 2010; TURNER; WEBSTER; MORRIS, 2013). Ao ser submetido a sessões de exercício em esteira, as concentrações de lactato corporal total de *O. quadrata* também elevaram (FULL, 1987). Nos caranguejos australianos, as sessões de exercício não foram realizadas em esteira, mas consistiram em um protocolo no qual os caranguejos eram persuadidos a caminharem continuamente por 10 minutos através de uma leve batida na carapaça ou por estímulos visuais (MORRIS et al., 2010; TURNER; WEBSTER; MORRIS, 2013). Portanto, o protocolo de exercício descrito por esses autores é comparável ao protocolo de manipulação realizado no presente trabalho. Logo, a elevação dos níveis de lactato imediatamente após a manipulação (Figura 6) está de acordo com esses trabalhos. Igualmente aos caranguejos australianos, os níveis de lactato na hemolinfa de *O. quadrata* permaneceram elevados após 30 minutos de recuperação (MORRIS et al., 2010; TURNER; WEBSTER; MORRIS, 2013). Os níveis de lactato hemolinfático reduziram aos 60 minutos de recuperação enquanto nos caranguejos australianos somente reduziu após 120 minutos (MORRIS et al., 2010; TURNER; WEBSTER; MORRIS, 2013) .

A concentração de glicose na hemolinfa (Figura 5) apresentou um comportamento inverso da concentração de lactato, aumentando ao longo da recuperação. A concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no coração não sofreu alterações significativas (Tabela 2), enquanto os níveis de glicogênio muscular aumentaram aos 30 minutos de recuperação (Figura 7). Esses resultados sugerem que o lactato formado pelo metabolismo anaeróbico está sendo convertido em glicose pela gliconeogênese muscular. No caranguejo *Neohelice granulata*, a gliconeogênese já foi demonstrada no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo, usando lactato, alanina e glicina como precursores (OLIVEIRA et al., 2004; OLIVEIRA; ROSSI; DA SILVA, 2001; PELLEGRINO et al., 2013; PELLEGRINO; KUCHARSKI; DA SILVA, 2008; VINAGRE; SILVA, 2002). A glicose recém-formada pela gliconeogênese pode ser convertida em glicogênio pela glicogenoneogênese no tecido muscular de *N. granulata* (PELLEGRINO; KUCHARSKI; DA SILVA, 2008). Assim, o aumento na concentração de glicogênio no músculo de *O. quadrata* pode ser explicado pela glicogenoneogênese.

A gliconeogênese intramuscular somada à queda de triglicerídeos na hemolinfa aos 30 minutos (Figura 4) sugere um *switch* metabólico que justifica uma economia de glicose hemolinfática. Uma possível utilização de triglicerídeos hemolinfáticos para formação de energia na periferia teria um efeito poupador de glicose para o correto funcionamento do sistema nervoso do animal.

A secreção de CHH é controlada pela concentração de glicose na hemolinfa por um mecanismo de retroalimentação negativa enquanto o lactato controla sua secreção por um mecanismo de retroalimentação positiva (SANTOS; KELLER, 1993; GLOWICK et al. 1997; CHUNG; WEBSTER, 2005; MORRIS et al. 2010). Em ambos os caranguejos australianos, o exercício causou elevação imediata nas concentrações de lactato na hemolinfa, seguida de aumentos na concentração de CHH e

por último, na glicose hemolinfática (MORRIS et al., 2010; TURNER; WEBSTER; MORRIS, 2013). Assim, presume-se que o aumento no lactato na hemolinfa de *O. quadrata* após a manipulação, provavelmente causou uma elevação na secreção de CHH. O aumento na glicemia aos 30 minutos poderia ser uma consequência desse aumento no CHH. A expressão gênica do CHH não foi alterada pelo estresse de manipulação (Figura 8). Alterações na secreção de CHH podem ou não estar relacionadas a alterações na expressão gênica. No lagostim *Procambarus clarkii*, a expressão de CHH somente começou a diminuir 24h após a administração de dsCHH (RNA silenciador) (LI et al., 2017) enquanto a concentração de CHH na glândula do Seio começou a diminuir 48h após a injeção e permaneceu inalterada na hemolinfa.

Apesar da sequência da HSP70 de *O. quadrata* já ter sido publicada no *GenBank*, não foram encontrados estudos sobre a expressão dessa proteína. Assim, essa parece ser a primeira demonstração da expressão de HSP70 nos pedúnculos oculares, hepatopâncreas e músculo nesse caranguejo (Figura 9). Entretanto, não foram encontradas diferenças 60 minutos após o estresse de manipulação. Apesar de alguns autores (CHAURASIA et al., 2016) mostrarem que o pedúnculo ocular é um dos tecidos que mais expressa HSP70 durante o repouso em camarões, por exemplo, esta expressão no pedúnculo ocular é responsiva à infecção por vírus apenas a partir de 3 horas da infecção. Já no siri *Portunus trituberculatus*, a expressão de HSP70 no pedúnculo ocular foi a menor, comparado com tecidos como hepatopâncreas, brânquias e hemócitos (CUI et al., 2010).

Em outro estudo (FU et al., 2013) também demonstrou que o pedúnculo ocular foi um dos tecidos que menos expressou HSP70 durante o repouso no siri *Scylla serrata* e que essa expressão só foi responsiva a partir de 3 horas de contaminação por patógenos. Nesse mesmo estudo, os autores ainda mostram que a expressão de HSP70 nas brânquias pode ser alterada por estímulos como aumento da

concentração de nitritos na água, diminuições ou aumentos drásticos na osmolaridade da água e ainda diminuições ou aumentos extremos na temperatura da água capazes de alterar a expressão dessa proteína em hemócitos.

Em hemócitos de mexilhões (LIU et al., 2014), a expressão de HSP70 foi estimulada por estresse térmico, exposição a cádmio e cobre, após 12 horas e cinco dias, respectivamente. A expressão da proteína voltou aos valores basais apenas 18 horas após o estresse térmico e 30 dias após a exposição aos metais pesados.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos após estresse de manipulação no caranguejo *Ocypode quadrata* evidenciam ajustes no metabolismo do animal para que seja possível a manutenção de performance muscular.

O estresse de manipulação foi capaz de modificar a concentração de alguns metabólitos hemolinfáticos como glicose, lactato e triglicerídeos, bem como a concentração de glicogênio do músculo da pata do animal.

Quanto maior a recuperação pós-estresse do animal, menor a concentração de lactato e maior a concentração de glicose, ambos hemolinfáticos. Entretanto, a concentração de triglicerídeos foi diminuída apenas 30 minutos após o estresse, voltando a valores basais 60 minutos após.

Esses resultados sugerem que há gliconeogênese intramuscular utilizando lactato como substrato. Ainda percebe-se um efeito poupador de glicose resultado da utilização desse lactato muscular somado à utilização dos triglicerídeos da hemolinfa, priorizando a glicose hemolinfática para o funcionamento do sistema nervoso central do animal.

A expressão de HSP70, bem como do CHH não apresentou alterações após uma hora de recuperação pós-estresse de manipulação, embora nenhum outro estudo tenha mostrado expressão dessa proteína citoprotetora no pedúnculo ocular nessas condições.

Novas investigações no que concerne ao destino do lactato formado durante trabalho muscular intenso com maiores tempos de recuperação são necessárias, bem como a expressão tanto de CHH e HSP70 nestas novas condições.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, F. et al. Seasonal Variations in the Biochemical Composition and Reproductive Cycle of the Ghost Crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. **J. Exp. Zool**, v. 313, n. November 2009, p. 280–291, 2010.

APARICIO-SIMÓN, B. et al. Neuroendocrine and metabolic responses of Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to acute handling stress. **Aquaculture**, v. 298, n. 3–4, p. 308–314, 2010.

BAO, X. N. et al. mRNA expression profiles of heat shock proteins of wild and salinity-tolerant swimming crabs, *Portunus trituberculatus*, subjected to low salinity stress. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 6837–6847, 2014.

BECKER, J.; CRAIG, E. A. Heat-shock proteins as chaperones. **Eur. J. Biochem.** **219**, 11-23; 1994.

BENETTI, M.; SANTOS, R. T. DOS; CARVALHO, T. DE. Cinética de lactato em diferentes intensidades de exercícios e concentrações de oxigênio. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 6, n. 2, p. 50–56, 2000.

BLANKENSTEYN, A. O uso do caranguejo maria-farinha *Ocypode quadrata* (Fabricius) (Crustacea, Ocypodidae) como indicador de impactos antropogênicos em praias arenosas da Ilha de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 3, p. 870–876, 2006.

CASTRO, S. V. et al. Proteínas de choque térmico hsp 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 4, p. 261–271, 2013.

CHANG, E. S. Stressed-Out Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins Integral. **Comp. Biol.** **45**, 43–50; 2005.

CHAURASIA, M. K. et al. Molecular importance of prawn large heat shock proteins 60, 70 and 90. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 48, p. 228–238, 2016.

CHENG, W.; CHIU, H.; YEH, S. Norepinephrine induces transient modulation of the physiological responses of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture** **254**, 693 – 700; 2006.

CHUNG, J. S. et al. Crustacean hyperglycemic hormones of two cold water crab species, *Chionoecetes opilio* and *C. japonicus*: Isolation of cDNA sequences and localization of CHH neuropeptide in eyestalk ganglia. **General and Comparative Endocrinology**, v. 214, p. 177–185, 2015.

CHUNG, J. S.; ZMORA, N. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* - The expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. **FEBS Journal**, v. 275, n. 4, p. 693–704, 2008.

CHUNG, J. S.; WEBSTER, S. G. Dynamics of in vivo release of molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology* 146:5545–5551, 2005.

COLSON-PROCH, C. et al. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: A study of the HSP70 gene expression. **Cell Stress and Chaperones**, v. 15, n. 3, p. 259–270, 2010.

CUI, Z. et al. Molecular cloning and characterization of a heat shock protein 70

gene in swimming crab (*Portunus trituberculatus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 56–64, 2010.

ELOFFSON, R.; LAZMYR, L.; ROSENGREN, E.; HANSSON, C. Identification and quantitative measurements of biogenic amines and dopa in the central nervous system and haemolymph of the crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Crustacea). **Comp. Biochem. Physiol.** **71C**, 195–201; 1982.

FANJUL-MOLES, M. L. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 3–4 SPEC. ISS., p. 390–400, 2006.

FEBBRAIO, M. A.; KOUKOULAS, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 89, n. 3, p. 1055–1060, 2000.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.** **61**, 243–282; 1999.

FEDER, E. M.; PARSELL, A. D.; LINDQUIST, S. The stress response and stress proteins. In: **Cell Biology of Trauma. (Lemasters, J. J. e Oliver, C. Eds), CRC Press. Boca Raton 177-191; 1995.**

FERNANDES, F. A. Estresse Osmótico: Proteínas de Estresse e Balanço Oxidativo em *Neohelice granulata* (Crustácea, Decapoda, Veronidae). **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** Porto Alegre, RS; 2010.

FINGERMAN, M.; NAGABHUSHAN, R. Control of the release of crustacean hormones by neuroregulators. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102C (3)**: 343-352; 1992.

FITTIPALDI, S. et al. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response. **Free Radical Research**, v. 48, n. 1, p. 52–70, 2014.

FREDERICH, M. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) in the rock crab, *Cancer irroratus*: an early indicator of temperature stress. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 5, p. 722–730, 2009.

FU, W. et al. Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic heat shock protein 70 gene from mud crab *Scylla serrata*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 5, p. 1306–1314, 2013.

FULL, R. J. Locomotion Energetics of the Ghost Crab: I. Metabolic Cost and Endurance. **J Exp Biol**, v. 130, n. 1, p. 137–153, 1987.

GLOWICK, R. M.; GOLOWASH, R.; KELLER, R.; MARDER, E. D-glucose-sensitive neurosecretory cells of the crab *Cancer borealis* and negative feedback regulation of blood glucose level. *J Exp Biol* 200:1421–1431, 1997

GRIGORE, M.; INDREI, A. The role of heat shock proteins in reproduction. **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi** **105**, 674-6; 2001.

HENRY, R. P. et al. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. **The Journal of Experimental Biology**, v. 186, n. 1, p. 215–34, 1994.

HOBBS, C. H.; LANDRY, C. B.; PERRY, J. E. Assessing Anthropogenic and Natural Impacts on Ghost Crabs (*Ocypode quadrata*) at Cape Hatteras National Seashore, North Carolina. **Journal of Coastal Research**, v. 24, n. 6, p. 1450–1458, 2008.

INOHARA, E. T. S. et al. Serotonin effects in the crab *Neohelice granulata*: Possible involvement of two types of receptors in peripheral tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, 2015.

KUO, C. M.; YANG, Y. H. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 169, n. 1, p. 49–54, 1999.

LI, W. et al. Differential effects of silencing crustacean hyperglycemic hormone gene expression on the metabolic profiles of the muscle and hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. **PLoS one**, v. 12, n. 2, p. e0172557, 2017.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The heat-shock proteins. **Annu. Rev. Genet.** **22**, 631-77; 1988.

LIU, H. H. et al. Identification and analysis of HSP70 from *Sepiella maindroni* under stress of *Vibrio harveyi* and Cd²⁺. **Gene**, v. 572, n. 1, p. 146–152, 2015.

LIU, H. HUI et al. Differential HSP70 expression in *Mytilus coruscus* under various stressors. **Gene**, v. 543, n. 1, p. 166–173, 2014.

LORENZON, S. Role of biogenic amines and cHH in the crustacean hyperglycemic stress response. **Journal of Experimental Biology**, v. 208, n. 17, p. 3341–3347, 2005.

LÜSCHEN, W.; WILLIG, A.; JAROS, P. P. The role of biogenic amines in the control of blood glucose level in the decapod crustacean, *Carcinus maenas*. **Comp. Biochem. Physiol. Vol. 105C, Nº 2**, pp. 291-296; 1993.

McDONALD, D. G.; McMAHON, B. R.; AANDWOOD, C. M. An analysis of acid–base disturbances in the haemolymph following strenuous activity in the dungeness crab, *Cancer magister*. **J. exp. Biol. 79**, 47–58; 1979.

MATSUMASA, M.; MURAI, M. Changes in blood glucose and lactate levels of male fiddler crabs: Effects of aggression and claw waving. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 3, p. 569–577, 2005.

MAZZEI, V. et al. Metallothioneins and heat shock proteins 70 in *Armadillidium vulgare* (Isopoda, Oniscidea) exposed to cadmium and lead. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 116, p. 99–106, 2015.

MORRIS, S. et al. The adaptive significance of crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in daily and seasonal migratory activities of the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis*. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. Pt 17, p. 3062–73, 2010.

NAKANO, T. et al. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 772–776, 2014.

NEGREIROS-FRANSOZO, M. L.; FRANSOZO, A.; BERTINI, G. Reproductive cycle and recruitment Period of *Ocypode Quadrata* (Decapoda, Ocypodidae) At a Sandy Beach in Southeastern Brazil. **Journal of Crustacean Biology**, v. 22, n. 1, p. 157–161, 2002.

NEVES, F. M.; BEMVENUTI, C. E. The ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) as a potential indicator of anthropic impact along the Rio Grande do Sul coast, Brazil. **Biological Conservation**, v. 133, n. 4, p. 431–435, 2006.

OLIVEIRA, G. T. et al. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 137, n. 2, p. 383–390, 2004.

OLIVEIRA, G. T.; ROSSI, I. C.; DA SILVA, R. S. M. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Marine Biology**, v. 139, n. 2, p. 335–342, 2001.

PELLEGRINO, R. et al. Effect of starvation and refeeding on amino acid metabolism in muscle of crab *Neohelice granulata* previously fed protein- or carbohydrate-rich diets. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 164, n. 1, p. 29–35, 2013.

PELLEGRINO, R.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 358, n. 2, p. 144–150, 2008.

PERRY, M. J. et al. Skeletal muscle fiber types in the ghost crab, *Ocypode quadrata*: implications for running performance. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 5, p. 673–683, 2009.

PIRKKALA, L.; NYKÄNEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 15, n. 7, p. 1118–1131, 2001.

POMBO, M.; TURRA, A. Issues to be considered in counting burrows as a measure of atlantic ghost crab populations, an important bioindicator of sandy beaches. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–7, 2013.

RITOSSA, F. M. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia*.18: 571-573, 1962.

SAINATH, S. B.; REDDY, P. S. Melatonergic regulation of hemolymph sugar levels in the freshwater edible crab, *Oziotelphusa senex senex*. **J. Exp. Zool.** **313A**: 201 – 208; 2010.

SANTOS, E. A.; KELLER, R. Effect of exposure to atmospheric air and blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp Biochem Physiol A* 106:343–347, 1993.

SCHLACHER, T. A.; THOMPSON, L.; PRICE, S. Vehicles versus conservation of invertebrates on sandy beaches: Mortalities inflicted by off-road vehicles on ghost crabs. **Marine Ecology**, v. 28, n. 3, p. 354–367, 2007.

SOUZA, S. K. et al. Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral

cortex. **Metabolic Brain Disease**, v. 28, n. 1, p. 25–32, 2013.

TULLIS, A.; ANDRUS, S. C. The cost of incline locomotion in ghost crabs (*Ocypode quadrata*) of different sizes. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 181, n. 7, p. 873–881, 2011.

TURNER, L. M.; WEBSTER, S. G.; MORRIS, S. Roles of crustacean hyperglycaemic hormone in ionic and metabolic homeostasis in the Christmas Island blue crab, *Discoplax celeste*. **The Journal of experimental biology**, v. 216, n. Pt 7, p. 1191–201, 2013.

VINAGRE, A. S.; CHUNG, J. S. Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). **Marine Biology**, v. 163, 2016.

VINAGRE, A. S.; RIBARCKI, A. P.; FRAGA, F. P.; SILVEIRA, E.; PÉRICO, E.. Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). 2006.

WEBSTER, S. G.; KELLER, R.; DIRCKSEN, H. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, n. 2, p. 217–233, 2012.

WEINSTEIN, R. B. LOCOMOTOR BEHAVIOR OF NOCTURNAL GHOST CRABS ON THE BEACH: FOCAL ANIMAL SAMPLING AND INSTANTANEOUS VELOCITY FROM THREE-DIMENSIONAL MOTION ANALYSIS. v. 999, p. 989–999, 1995.

WEINSTEIN, R. B.; FULL, R. J.; AHN, A. N. Moderate dehydration decreases locomotor performance of the ghost crab, *Ocypode quadrata*. **Physiological Zoology**, v. 67, n. 4, p. 873–891, 1994.

WOOD, C.; RANDALL, D. J. Haemolymph gas transport, acid–base regulation and anaerobic metabolism during exercise in the land crab (*Cardisoma carnifex*). **J. exp. Zool.** **218**, 23–35; 1981.

YENARI, M. A.; GIFFARD, G. R. G.; SAPOLSKY, R. M.; STEINBERG, G. K. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). **Mol. Med. Today** **5**, 525-31; 1999.