

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

**ESTRESSE OSMÓTICO: SÍNTESE DE LIPÍDIOS A PARTIR DE AMINOÁCIDOS  
EM CARANGUEJOS *Neohelice granulata* (DANA, 1851)**

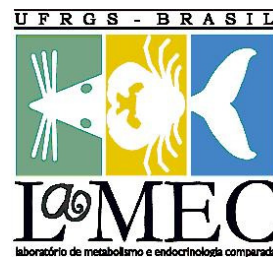
Dissertação de Mestrado

TIAGO LEAL MARTINS

Porto Alegre, 2008



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



**ESTRESSE OSMÓTICO: SÍNTESE DE LIPÍDIOS A PARTIR DE AMINOÁCIDOS**  
**EM CARANGUEJOS *Neohelice granulata* (DANA, 1851)**

TIAGO LEAL MARTINS

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

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

Porto Alegre, 2008

## **Comissão Examinadora**

Denise Maria Zancan

Prof<sup>a</sup> Doutora do Programa de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS

Vera Maria Treis Trindade

Prof<sup>a</sup> Doutora do Programa de Pós-graduação em  
Ciências Biológicas: Bioquímica – UFRGS

Carolina Arruda de Oliveira Freire

Prof<sup>a</sup> Doutora do Programa de Pós-graduação em  
Biologia Celular e Molecular – UFPR

Dedico este trabalho à minha família

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Professora Roselis Silveira Martins da Silva, que gentilmente me acolheu em sua equipe e possibilitou a realização deste trabalho, depositando muita confiança, paciência e transferindo conhecimentos.

À minha família, que desde sempre acreditou em mim e me apoiou nos momentos difíceis.

Ao Professor Luiz Carlos Kucharski pela parceria e por estar sempre disposto a ajudar e partilhar seus conhecimentos.

Aos mais que colegas, os grandes amigos que fiz no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) por proporcionarem um ambiente agradável para trabalhar e pelos momentos de prazer e descontração regados a muito “amargo”.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia por me guiarem na busca do conhecimento e contribuírem na minha formação docente.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia pela convivência e amizade.

Às funcionárias da secretaria do curso de Pós-graduação em Fisiologia pelo carinho e dedicação no atendimento às necessidades dos alunos.

Aos colegas do curso de Especialização em Toxicologia, que recentemente ingressaram na minha vida, mas puderam acompanhar os instantes finais deste trabalho me apoiando muito durante este período.

Aos amigos de longa data, que de uma forma ou de outra também tornaram possível a concretização deste projeto, seja por palavras de incentivo ou no convite

para umas “*happy hours*” nos redutos boêmios da minha amada Porto Alegre, a fim de “desencanar” dos problemas relacionados ao trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos e auxílio financeiro.

## RESUMO

No ambiente estuarino, hábitat do caranguejo *Neohelice granulata*, a salinidade pode variar de 0,22‰ a 34‰, implicando em mudanças comportamentais e fisiológicas neste animal. Este estudo teve como objetivo verificar os efeitos do estresse hiper e hiposmótico sobre a via lipogênica a partir de glicina em diferentes tecidos de *N. granulata*, bem como a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK).

No presente trabalho, aumentos na incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicina em  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais foram constatados nas brânquias anteriores (estresse hiposmótico) e posteriores (hiperosmótico). Este aumento provavelmente ocorreria via gliceroneogênese, já que também foi constatado o incremento na atividade da enzima PEPCK. Nestes órgãos a atividade desta enzima ocorre tanto na fração citosólica como na mitocondrial, o que permitiria a conversão da glicina em glicerol, mantendo, assim, o ciclo triacilglicerol/ácido graxo nesses tecidos.

Nas brânquias posteriores (no estresse hiposmótico), no músculo e no hepatopâncreas a síntese de lipídios através da formação de ácidos graxos a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina seria uma via de ajuste de concentração de aminoácidos livres intracelulares em resposta ao estresse osmótico.

O presente estudo demonstra que a lipogênese a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina seria uma via metabólica que estaria envolvida no processo de aclimação ao estresse osmótico em *N. granulata*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse osmótico, lipogênese, aminoácido, PEPCK, caranguejo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**$\alpha$ -KG** – Alfa-cetogluturato

**ANOVA** – Análise de variância

**Asp** – Aspartato

**ATP** – Adenosina trifosfato

**DHAF** – Diidroxiacetona fosfato

**Glut** – Glutamato

**GSH** – Glutathiona reduzida

**GTP** – Guanosina trifosfato

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**HEPES** – N-[2-hidroxiethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

**ITP** – Inosina trifosfato

**MeAIB** – Ácido metal-aminoisobutírico

**OAA** – Oxaloacetato

**PC** – Piruvato carboxilase

**PEP** – Fosfoenolpiruvato

**PEPCK** – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

**PMSF** – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

**POPOP** – 1,4-bis[2-(5-Phenyloxazoly)]benzene

**PPO** – 2,5-Diphenyloxazole

**SFC** – Solução fisiológica de caranguejo

**SNK** – *Student-Newman-Keuls*

**TCA** – Ácido tricloracético

**TMAO** – Óxido de trimetilamina



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mecanismos que podem estar implicados no controle da concentração de aminoácidos livres tissulares.....	05
<b>Figura 2</b> – Esquema da via lipogênica a partir de glicina.....	09
<b>Figura 3</b> – Esquema da síntese de triglicéridios.....	10
<b>Figura 4</b> – Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de $^{14}\text{C}$ -glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais (A) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B), nas brânquias anteriores de caranguejos <i>N. granulata</i> .....	23
<b>Figura 5</b> – Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de $^{14}\text{C}$ -glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais (A) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B), nas brânquias posteriores de caranguejos <i>N. granulata</i> .....	25
<b>Figura 6</b> – Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de $^{14}\text{C}$ -glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais (A) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B), no músculo da mandíbula de caranguejos <i>N. granulata</i> .....	27
<b>Figura 7</b> – Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de $^{14}\text{C}$ -glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais (A) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B), no hepatopâncreas de caranguejos <i>N. granulata</i> .....	29
<b>Figura 8</b> – Vias metabólicas envolvidas no fluxo de aminoácidos livres tissulares na regulação osmótica em <i>N. granulata</i> .....	39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1 Animais.....	17
3.2 Procedimentos experimentais.....	17
3.3 Determinação da conversão de <sup>14</sup> C-glicina em <sup>14</sup> C-lipídios.....	18
3.4 Determinação da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxi- quinase (PEPCK (E.C. 4.1.1.32)).....	20
3.5 Determinação de proteínas.....	21
3.6 Análise estatística.....	21
<b>4. RESULTADOS</b> .....	22
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	40

# 1. INTRODUÇÃO

O ecossistema estuarino representa uma transição entre o ambiente marinho e límnic e se caracteriza pela presença de sedimento fino de origem marinha, fluvial ou terrestre que se acumula formando planícies de barro ricas em alimento, mas escassas em oxigênio (McLusky, 1989). As freqüentes variações do cenário, em vista da ação constante das marés, alternando períodos de total cobertura do meio pelas águas e de exposição do substrato, além dos fatores meteorológicos, exercem um controle seletivo e severo sobre as espécies nativas.

O estresse provocado pelas alterações de fatores como salinidade, temperatura ou teor de O<sub>2</sub> na água, leva à utilização de estratégias comportamentais e fisiológicas pelos organismos, capacitando-os a tolerar tais oscilações características do meio estuarino (Odum, 1985; Miranda, 1994).

Considerando-se as variações na concentração osmótica dos fluidos corporais dos organismos aquáticos em resposta às variações de salinidade do meio, distinguem-se duas formas de ajustes osmóticos: osmoconformação e osmorregulação. Nas espécies osmoconformadoras, a pressão osmótica intracelular pode variar de acordo com a variação da osmolaridade do meio, ou seja, esses animais mantêm a osmolaridade dos seus fluidos corporais semelhante àquela do meio em que se encontram. As espécies osmorreguladoras são capazes de tolerar variações na salinidade do meio com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa (Péqueux, 1995; Schmidt-Nielsen, 2002).

O caranguejo *Neohelice granulata*, também conhecido popularmente como “catanhão” ou “gatanhão”, é uma espécie endêmica do ambiente estuarino e se distribui desde o Rio de Janeiro até o golfo de San Matias (Argentina) (Boschi,

1964), onde a salinidade pode variar de 0,22‰ a 34‰ (Turcato, 1990). Cava sua toca geralmente nas regiões supralitoral e mesolitoral superior, deslocando-se para o mesolitoral inferior e infralitoral em busca de umidade e de alimento (Bond-Buckup *et al.*, 1991).

Este caranguejo, assim como outros braquiúros eurialinos, ou seja, tolerantes às grandes amplitudes na salinidade do meio, possui capacidade osmorreguladora, apresenta hemolinfa hiposmótica em meio concentrado, ao passo que em meio diluído, sua hemolinfa é hiperosmótica (Mañe-Garzon *et al.*, 1974). Seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e no verão, respectivamente (Bromberg, 1992).

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

A capacidade de regulação isosmótica do fluido intracelular parece ser um pré-requisito para a invasão de espécies marinhas a ambientes osmoticamente diferentes. Tais espécies, uma vez estabelecidas, perderiam esta capacidade depois de um longo período evolutivo nestes ambientes (Freire *et al.*, 2008 a).

Estudos realizados em várias espécies eurialinas mostraram que as células desses animais estabelecem uma relação de isosmolaridade, com relativa rapidez, com o fluido extracelular. Esta regulação é realizada principalmente por altas concentrações de efetores osmóticos orgânicos, e não por meio de altas concentrações de osmólitos inorgânicos como sódio, potássio ou cloreto. Os principais osmó-

litos orgânicos em eucariotos, que vivem em ambiente aquático estressante, estão restritos a uma pequena classe de moléculas com baixo peso molecular: polióis (p.ex. glicerol, manitol e sacarose); aminoácidos livres e derivados de aminoácidos (p.ex. taurina e alanina); uréia e metilaminas (p.ex. trimetilamina-N-óxido-TMAO, betaína e sarcosina) (Yancey *et al.*, 1982). No caso da betaína, é particularmente interessante observar que esse composto, derivado da colina, após sucessivas desmetilações dá origem à dimetilglicina, à metilglicina e à glicina (Viana *et al.*, 2005). Jahn *et al.* (2006) demonstraram a importância da colina e de glicina betaína na regulação osmótica em *N. granulata*. Os autores constataram um aumento na captação de colina e na conseqüente formação de glicina betaína no hepatopâncreas de caranguejos submetidos ao estresse hiperosmótico.

Mudanças na concentração de osmólitos orgânicos no fluido extracelular influenciam diretamente rotas metabólicas, por meio de alterações no fluxo de metabólitos para as células. Desta forma, altera a concentração de hormônios e outras moléculas sinalizadoras, levando a alteração na expressão de genes que codificam proteínas reguladoras ou enzimas chave do metabolismo intermediário. Estas alterações metabólicas estão diretamente envolvidas nas respostas fisiológicas e bioquímicas estratégicas para a integridade celular face às alterações no meio extracelular (Schliess e Häussinger, 2002).

Diversos autores sugerem um controle neuroendócrino sobre o mecanismo osmorregulatório (Mcnamara *et al.*, 1990; Eckhardt *et al.*, 1995; Freire *et al.*, 1995).

Em *Macrobrachium olfersii*, fatores neuroendócrinos, presentes no Sistema Nervoso, atuam sobre a regulação de aminoácidos livres da hemolinfa. O homogenizado de gânglio torácico aumentou a quantidade de aminoácidos livres na hemolinfa de camarões mantidos em água doce, e diminuiu estes compostos nitrogenados

na hemolinfa de animais submetidos ao estresse hiperosmótico (Freire *et al.*, 1995).

Os aminoácidos exercem muitas funções nos processos biológicos. Além de serem precursores da biossíntese de proteínas, de carboidratos e de lipídios, os aminoácidos também são utilizados como fonte energética, como transportadores/doadores de átomos de carbono e de nitrogênio, como neurotransmissores ou neuromoduladores, como componentes de sistemas de tamponamento, e como osmólitos (Kilberg e Haüssinger, 1992).

Nos crustáceos eurialinos a concentração de aminoácidos tissulares é cerca de dez vezes mais elevada que a encontrada em tecidos de mamíferos, enquanto que os níveis desses osmólitos orgânicos no fluido extracelular são equivalentes aos destes animais (Gilles, 1987). A mobilização dos aminoácidos nos tecidos, durante o ajuste homeostático ao estresse osmótico, estaria envolvida com a utilização dos mesmos em três mecanismos básicos: a) deslocamento do equilíbrio entre influxo e efluxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; b) alterações na capacidade de síntese e de oxidação destes aminoácidos livres tissulares; c) alterações na capacidade de síntese e de mobilização de proteínas, de carboidratos e de lipídios (Figura 1) (Gilles, 1982; Turcato, 1990).

Em algumas espécies eurialinas, a quantidade de aminoácidos livres representa apenas 10-20% da concentração osmótica intracelular (Gilles, 1997). Essas espécies, geralmente, utilizam metilaminas nas respostas regulatórias de volume celular (Gilles e Delpire, 1997). Schein *et al.* (2005 b) mostraram que a captação de

$^{14}\text{C-MeAIB}^1$  aumenta no músculo mandibular e no hepatopâncreas de caranguejos submetidos ao estresse hiperosmótico.

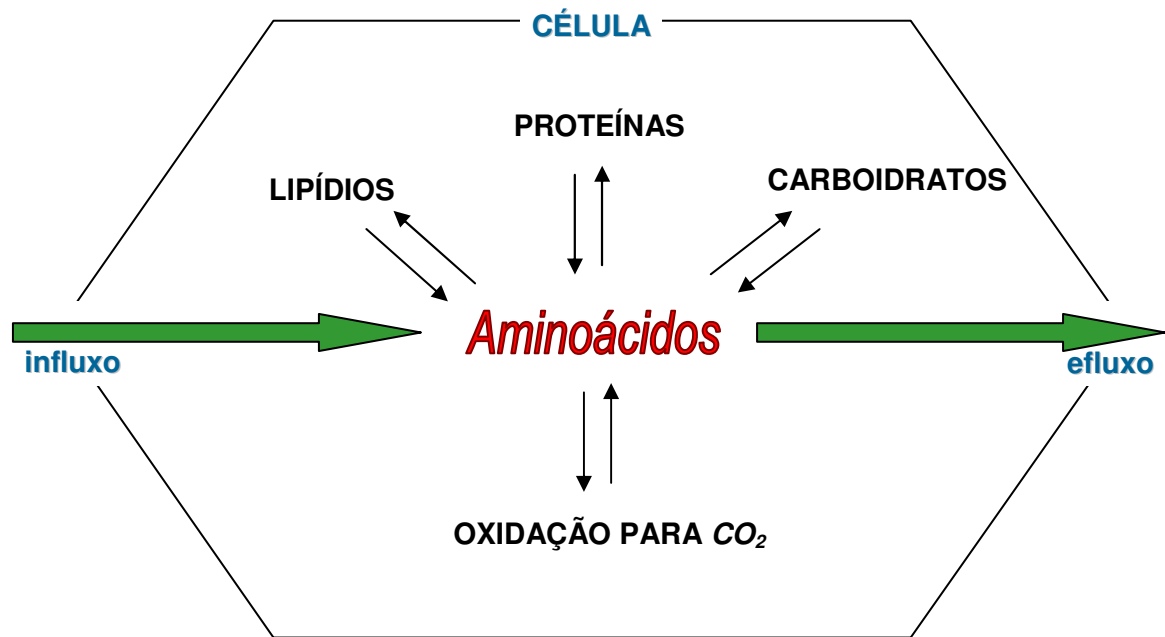


Figura 1 – Mecanismos que podem estar implicados no controle da concentração de aminoácidos livres tissulares (segundo Gilles, 1982).

No hepatopâncreas e no músculo da mandíbula de *N. granulata*, o transporte de alanina via sistema A<sup>2</sup> é um dos mecanismos envolvidos no ajuste da concentração de aminoácidos durante o estresse hiperosmótico (Schein *et al.*, 2005 b). Em invertebrados, estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado que o aumento dos aminoácidos intracelulares, durante o estresse hiperosmótico, envolve a captação de compostos nitrogenados do líquido extracelular (Gilles e Delpire, 1997; Gilles, 1998).

<sup>1</sup>  $^{14}\text{C-MeAIB}$ : ácido  $^{14}\text{C}$ -metilaminoisobutírico, usado como modelo para identificar o transporte de aminoácidos via sistema A.

<sup>2</sup> Sistema A: Sistema de transporte de aminoácidos dependente de  $\text{Na}^+$ .

Schein *et al.* (2005 b) constataram que durante o estresse hiperosmótico, a redução da oxidação de  $^{14}\text{C}$ -alanina parece ser um dos mecanismos envolvidos no aumento da concentração de aminoácidos livres intracelulares no hepatopâncreas de *N. granulata*. Ao passo que no estresse hiposmótico, a oxidação total de aminoácidos não estaria envolvida na diminuição das concentrações de osmólitos orgânicos no hepatopâncreas e no músculo mandibular. Schein (1999) observou também que durante o estresse hiperosmótico, a concentração do aminoácido glicina na hemolinfa de *N. granulata* diminui cerca 60%. Bock (2005) verificou que a síntese de proteínas, a captação e a oxidação de aminoácidos estariam envolvidas nas variações de concentração de aminoácidos intracelulares em hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata*, submetidos ao estresse osmótico agudo *in vitro*.

A participação do metabolismo de carboidratos, durante o processo de aclimatação ao estresse osmótico, foi demonstrada no músculo, no hepatopâncreas e nas brânquias de caranguejo *N. granulata* (Da Silva e Kucharski, 1992; Schein, 1999; Oliveira e Da Silva, 2000; Schein *et al.*, 2004; 2005 a; Chittó *et al.*, 2008 a).

Assim como em outros crustáceos, o tecido branquial deste animal apresenta uma diferenciação funcional e estrutural. Os três pares de brânquias posteriores constituem o principal sítio osmo e ionorregulador das espécies eurialinas, enquanto os três anteriores estão mais associados à função respiratória e excreção de amônia (Bianchini *et al.*, 2008; Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008 b).

A diminuição na concentração de glicose livre nas brânquias anteriores e posteriores durante o estresse hipo e hiperosmótico indica a utilização deste substrato como fonte de energia no processo de aclimatação ao estresse osmótico (Chittó, 2000).



Segundo Oliveira e Da Silva (2000), a via gliconeogênica hepatopancreática também estaria implicada no ajuste da concentração de aminoácidos durante a aclimatação ao estresse hiposmótico em *N. granulata*. As autoras ainda constataram um aumento dos níveis de uréia na hemolinfa, sugerindo um aumento do catabolismo de aminoácidos em resposta ao estresse hiposmótico. Chittó *et al.* (2008 a) observaram uma redução de cerca de 34% na conversão de  $^{14}\text{C}$ -glicerol em  $^{14}\text{C}$ -glicose nas brânquias posteriores de *N. granulata* expostos por 3 dias em meio concentrado, comprovando a participação da via gliconeogênica como uma das vias envolvidas no ajuste metabólico durante a aclimatação ao estresse hiperosmótico em brânquias.

Os lipídios teciduais também participam do ajuste metabólico ao estresse osmótico em caranguejos. Em *N. granulata*, submetido ao estresse osmótico durante os meses de verão, ocorre diminuição na concentração de lipídios totais nas brânquias posteriores, no hepatopâncreas e no músculo, sugerindo a utilização desse substrato energético durante o esforço de aclimatação ao estresse (Chittó *et al.*, 2008 a).

Os principais lipídios em crustáceos são os lipídios neutros, entre estes, 90% são triglicerídios (Allen *et al.*, 2000). Os lipídios de crustáceos são transportados na hemolinfa por lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Garcia *et al.*, 2002). O músculo, o hepatopâncreas e as gônadas são locais de armazenamento de lipídios, pois não há um tecido adiposo diferenciado em crustáceos (Kucharski e Da Silva, 1991; Rosa e Nunes, 2002). Diversos estudos têm demonstrado que durante períodos de grande demanda energética, como a muda e a gametogênese, ocorre uma marcante mobilização de lipídios, principalmente, aqueles presentes no hepatopâncreas.

Em mamíferos, o ciclo triglicerídio/ácido graxo requer não apenas ácidos graxos, mas também glicerol 3-fosfato para a síntese de triglicerídios. A glicose é o principal precursor de glicerol 3-fosfato durante o estado alimentado. Entretanto, durante o jejum, quando a lipólise no tecido adiposo é induzida pelas baixas concentrações de insulina circulante, a disponibilidade de glicose é limitada em função do seu papel crucial no metabolismo de tecidos fundamentais. O glicerol não pode ser usado pelo tecido adiposo devido aos níveis insignificantes da enzima glicerol quinase neste tecido (Hanson e Reshef, 2003). Para manter o ciclo triglicerídio/ácido graxos ocorre a formação de glicerol 3-fosfato a partir de outros compostos como piruvato, lactato e alanina por uma via denominada gliceroneogênese.

A gliceroneogênese foi descoberta na década de 60 por Lea Reshef, Richard Hanson e John Ballard, e simultaneamente por Eleazar Shafir e seus colaboradores, os quais ficaram intrigados pela presença de duas enzimas gliconeogênicas, piruvato carboxilase (PC) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), no tecido adiposo, onde a glicose não era sintetizada (Nelson e Cox, 2004). Esta via é uma versão reduzida da gliconeogênese, de piruvato à diidroxiacetona fosfato (DHAF), seguido pela conversão de DHAF em glicerol 3-fosfato pela ação da glicerol 3-fosfato desidrogenase. O glicerol 3-fosfato é subsequentemente utilizado na síntese de triglicerídios (Figura 2) (Devlin, 2002).

A conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato ocorre em duas etapas separadas que requerem compostos de fosfato de alta energia (1 ATP e 1 GTP). A primeira é catalisada pela PC, que converte piruvato em oxaloacetato e envolve a hidrólise de um ATP (adenosina trifosfato). Há duas vias que podem ser adotadas pelo oxaloacetato para chegar a DHAF. Isto acontece porque a PEPCK está presente tanto no compartimento citosólico como no mitocondrial. A via mais simples

envolve a PEPCK mitocondrial. O OAA é convertido em PEP que, então, atravessa a membrana mitocondrial para o meio citosólico. A segunda via envolve a conversão de OAA em aspartato que é transportado para o citosol através do antiporte glutamato-aspartato. No citosol, a transaminação com  $\alpha$ -cetoglutarato converte o aspartato novamente em oxaloacetato, que é descarboxilado pela PEPCK citosólica. No compartimento citosólico, o PEP sofre sucessivas reações até formar gliceraldeído 3-fosfato. Este composto pode ser convertido a DHAF, numa reação reversível catalisada pela triose fosfato isomerase (Figura 2) (Devlin, 2002).

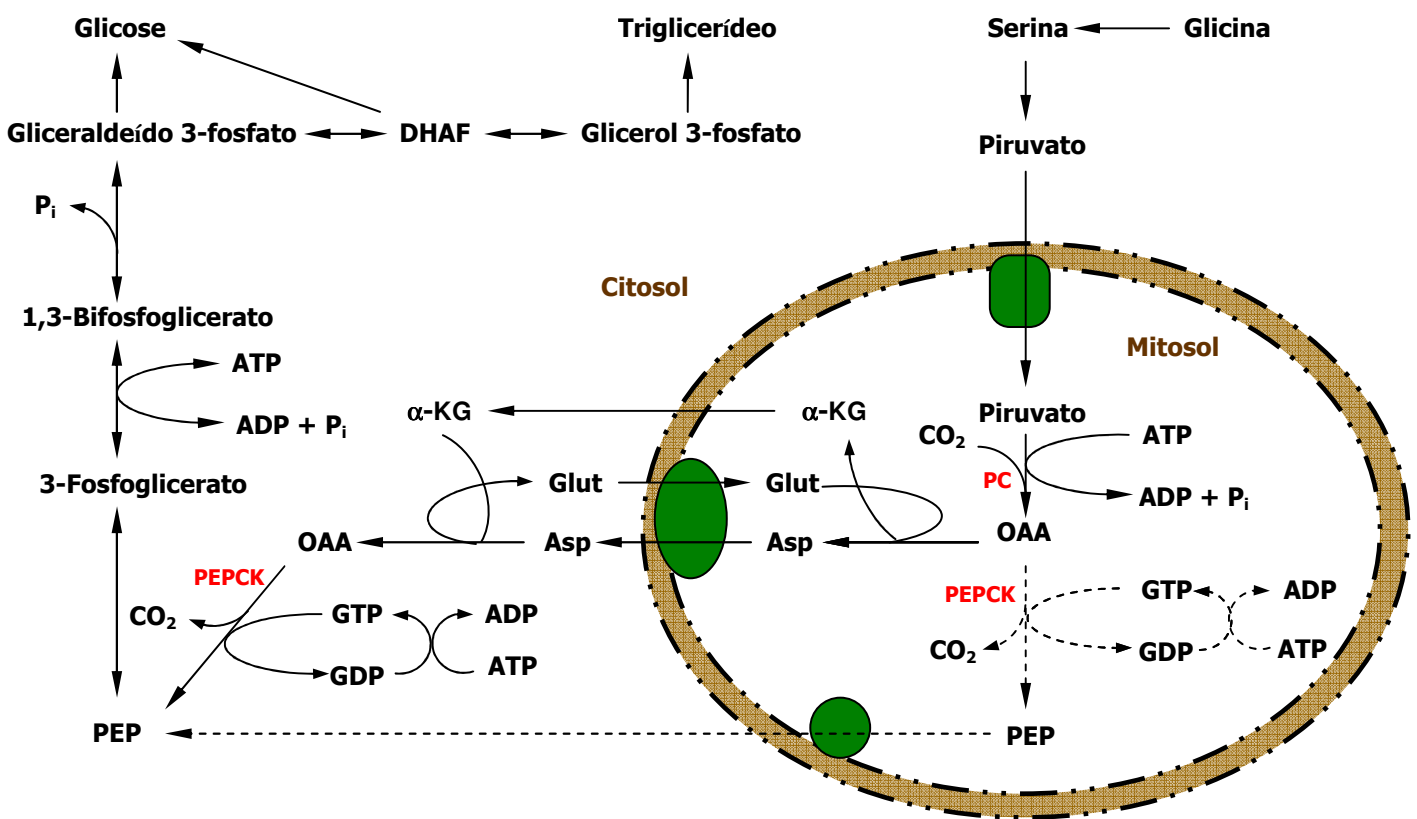


Figura 2 – Esquema da via lipogênica a partir de glicina, mostrando alguns dos principais substratos e as enzimas-chave dessa via. PC: piruvato carboxilase, PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinase, OAA: oxaloacetato, PEP: fosfoenolpiru-

vato, Asp: aspartato, Glut: glutamato,  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -cetogluturato, DHAF: diidroxiacetona fosfato. Adaptado de Devlin, 2002.

O primeiro passo da síntese de triglicerídios é a incorporação de dois acil-CoA ao glicerol 3-fosfato formado a partir de DHAF ou glicerol, dando origem ao ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico é hidrolisado à 1,2-diacilglicerol, que pode ser convertido à triglicerídio pela transesterificação com um terceiro acil-CoA (Figura 3) (Nelson e Cox, 2004).

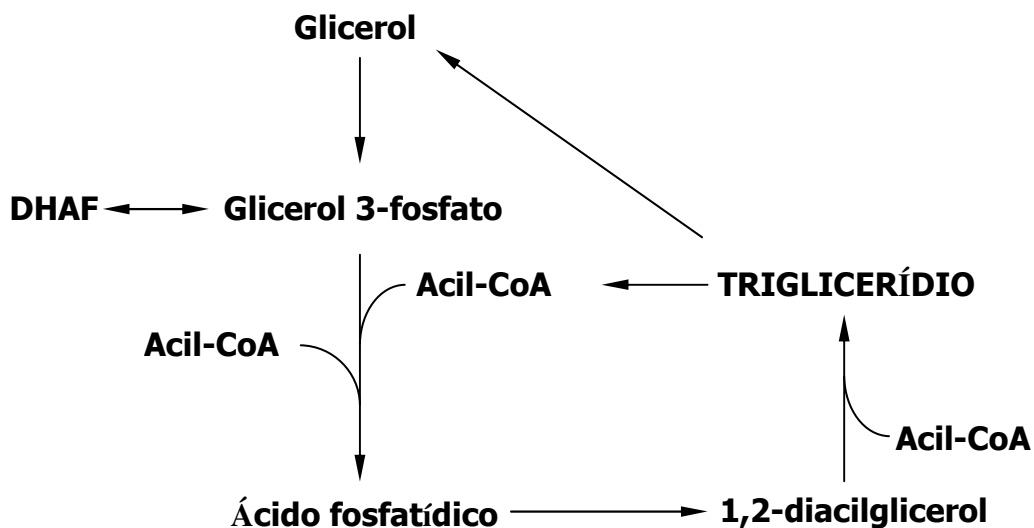


Figura 3 – Esquema da síntese de triglicerídios. Adaptado de Nelson e Cox, 2004.

A distribuição da PEPCK entre as frações celulares varia entre as espécies (Moon, 1988). Conforme a espécie estudada, a PEPCK pode se localizar na mitocôndria, no citosol ou em ambos os compartimentos, como ocorre em humanos (Marks *et al.*, 1996). Em aves, a PEPCK hepática é mitocondrial (Moon, 1988). Em

ratos e camundongos, a PEPCK hepática é principalmente citosólica, em outros mamíferos, como nos coelhos e nos porcos da Índia (Wiese *et al.*, 1991; Somberg e Mehlman, 1969), está presente nos dois compartimentos do hepatócito.

A maior diferença entre as duas isoformas da enzima é o tipo de regulação da expressão de seus genes. A regulação transcricional da expressão gênica da PEPCK citosólica (PEPCKc) é modulada por dieta ou sinalização hormonal, o que resulta em alteração na síntese desta enzima (Croniger *et al.*, 2002). Entretanto, em vertebrados, a PEPCK mitocondrial hepática é expressa constitutivamente, não sendo controlada por estes fatores (Croniger *et al.*, 2002).

Alguns estudos têm discutido a importância da isoforma citosólica no metabolismo lipídico em mamíferos (Croniger *et al.*, 2002; Hanson e Reshef, 2003; Reshef *et al.*, 2003; Beale *et al.*, 2002; Hanson, 2005). Olswang *et al.* (2002) produziram camundongos geneticamente modificados em que foi suprimido o sítio de ligação para o PPAR $\gamma$ 2<sup>3</sup>, que regula a expressão gênica da PEPCKc em tecido adiposo. Os autores demonstraram que esta linhagem de camundongos apresentava níveis normais de PEPCKc no fígado e nos rins, porém nada no tecido adiposo. Os animais ainda apresentavam quantidades reduzidas de gordura corporal e aproximadamente 25% dos camundongos eram lipodistróficos. Por outro lado, Frankhouser *et al.* (2002) verificaram que a superexpressão da PEPCKc no tecido adiposo de camundongos resulta em animais obesos devido ao aumento da taxa de re-esterificação e da gliceroneogênese.

Brito *et al.* (1999) demonstraram que em ratos alimentados com uma dieta rica em proteínas ocorre a indução da gliceroneogênese a partir de alanina, de piruvato e de lactato no tecido adiposo marrom, e um aumento de cerca de quatro

---

<sup>3</sup> PPAR $\gamma$ 2: Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma expresso no tecido adiposo.

vezes na atividade da enzima PEPCKc, levando ao aumento da re-esterificação de ácidos graxos livres.

Zammit e Newsholme (1978) verificaram a atividade da PEPCK no músculo do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus* e da lagosta *Homarus vulgaris* e sugeriram que essa enzima catalisa a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, sendo parte da via de oxidação de alguns aminoácidos nos músculos desses animais. No hepatopâncreas e no manto do molusco *Megalobulimus oblongus* a atividade da enzima PEPCK é predominantemente mitocondrial, entretanto, no coração e no diafragma a maior atividade foi constatada na fração citosólica (Dias, 1996; 2000).

Em caranguejos *N. granulata* a PEPCK foi clonada (AY074922) e sua expressão determinada no hepatopâncreas, no músculo, no sistema nervoso, nas brânquias e no coração (Schein *et al.*, 2004).

Oliveira e Da Silva (1997) demonstraram, pela primeira vez, a presença da via gliconeogênica e a atividade da PEPCK no hepatopâncreas de *N. granulata*. As autoras constataram que entre 84 e 89% da atividade desta enzima era mitocondrial. Schein *et al.* (2004) demonstraram que no músculo da mandíbula deste mesmo caranguejo mais de 90% da atividade da PEPCK é mitocondrial, evidenciando similaridade com os valores encontrados no hepatopâncreas. No mesmo trabalho foi constatado um aumento significativo na expressão e na atividade da enzima durante o choque hiperosmótico, sugerindo que a gliconeogênese colabora no ajuste metabólico durante este tipo de estresse. Os resultados desse trabalho também sugerem que em crustáceos, a isoforma mitocondrial não seria constitutiva, como ocorre em mamíferos, já que sua expressão pode ser modulada pelo estresse osmótico. Recentemente, Maciel (2007) demonstrou que a atividade e a ex-

pressão da PEPCK muscular também seriam controladas pelo teor de oxigênio no meio e pela composição da dieta administrada aos caranguejos.

Chittó *et al.* (2008 b) verificou que, contrariamente ao que ocorre no músculo e no hepatopâncreas, a atividade da enzima PEPCK está presente tanto na fração mitocondrial como na citosólica em brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata*.

A sazonalidade também altera o perfil metabólico de crustáceos. Rosa e Nunes (2002), em seu trabalho com três diferentes espécies de crustáceos decápodes, mostraram que o ciclo reprodutivo tem efeitos marcantes sobre a dinâmica de lipídios em crustáceos. Os lipídios são a principal fonte de energia metabólica para o desenvolvimento embrionário e sua quantidade correlaciona-se com o tamanho dos ovos, com o intervalo de tempo entre a postura, a incubação e a primeira alimentação das larvas. Durante o período de maturação gonadal os ovários tornam-se um centro adicional para o metabolismo lipídico, incluindo a lipogênese (síntese de triacilglicerol). Sob estas circunstâncias, o requerimento lipídico parece ser dependente do aporte de lipídios da dieta e/ou das reservas hepatopancreáticas (Ferreira *et al*, 2005).

Esta variação sazonal já foi verificada em outros crustáceos. Ferreira *et al* (2005), estudando o perfil metabólico em *Aegla platensis*, submetida a diferentes dietas, observou um aumento da demanda energética no verão, possivelmente para a produção de gametas; a incubação e a postura dos ovos no outono e no inverno respectivamente, visto que em ambiente natural o outono antecede os meses de ocorrência do pico reprodutivo da espécie. Em *N. granulata* o glicogênio é a principal fonte de energia durante a primavera e o verão, ao passo que os lipídios

do músculo são mais utilizados durante o outono e o inverno (Kucharski e Da Silva, 1991).

Luvizzotto-Santos *et al.* (2003) verificaram diferenças sazonais na concentração de lipídios totais em tecidos de *N. granulata*, constatando concentrações maiores de lipídios em animais de inverno quando comparados aos caranguejos de verão. As concentrações de lipídios totais nas brânquias e no músculo foram significativamente menores em caranguejos expostos por sete dias ao meio hiposmótico do que naqueles submetidos ao mesmo período de estresse hiperosmótico ou mantidos em condições controle. Assim como relatado para outros crustáceos, o hepatopâncreas de *N. granulata* apresentou altas concentrações lipídicas em relação aos outros tecidos.

Em *N. granulata* previamente alimentado com uma dieta rica em proteína ou carboidratos, Vinagre e Da Silva (1992) constataram um consumo acentuado dos lipídios do hepatopâncreas e do músculo ao final de um período de jejum de 8 semanas, evidenciando a utilização deste substrato energético durante o jejum longo. Os autores ainda observaram que a lipogênese, no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias, não foi alterada nestes animais quando mantidos em jejum por 3 semanas. Entretanto, a realimentação de 48 horas após o jejum de 3 semanas, elevou a síntese de lipídios no hepatopâncreas (Vinagre e Da Silva, 2002).

Kucharski e Da Silva (1991) verificaram que em *N. granulata* alimentados com uma dieta rica em proteínas há uma maior concentração de lipídios totais no hepatopâncreas em relação aos animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos e aos animais coletados do campo.

Na maioria dos crustáceos eurialinos, como o *N. granulata*, sabe-se que os aminoácidos intracelulares são utilizados como osmólitos orgânicos para a regula-



ção do volume celular. Nos crustáceos em geral, o principal lipídio armazenado é o triacilglicerol. Assim a pergunta que o presente trabalho gostaria de esclarecer é: Haveria um controle da capacidade de síntese de lipídios a partir de aminoácidos durante a aclimação ao estresse osmótico em tecidos de *Neohelice granulata*?

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi verificar os efeitos dos estresses hiperosmótico e hiposmótico sobre a via lipogênica e sobre a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) em diferentes tecidos do caranguejo *N. granulata*.

Para isto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1) Avaliar a capacidade lipogênica, através da conversão de  $^{14}\text{C}$ -glicina em  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais, nas brânquias anteriores e posteriores, no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de animais do grupo controle ou submetidos a 24, 72 e 144 horas de estresse hiperosmótico ou hiposmótico.

2) Determinar a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) nas brânquias anteriores e posteriores, no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de animais do grupo controle ou submetidos a 24, 72 e 144 horas de estresse hiperosmótico ou hiposmótico.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. Animais

Foram utilizados caranguejos *Neohelice granulata* (*Chasmagnathus granulatus* Dana 1851) (Crustacea, Brachyura, Varunidae) machos em estágio C do ciclo intermudas (Drach e Tchernigovtzeff, 1967), a fim de minimizar os efeitos dos períodos de ecdise.

A coleta foi realizada na margem da Lagoa Tramandaí, no município de Imbé (RS), durante a primavera e o verão. Os animais foram capturados manualmente e acondicionados em caixas plásticas, com água do próprio local, durante o transporte até o laboratório, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde na UFRGS, em Porto Alegre (RS).

No laboratório, os caranguejos foram submetidos ao choque hiposmótico com água destilada por 24 horas, para eliminação de possíveis parasitas e limpeza do conteúdo estomacal (Kucharski, 1990). Após este procedimento, os animais foram mantidos por 10 dias em tanque contendo água com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural, aeração constante. Os caranguejos foram alimentados, *ad libitum*, com carne bovina crua, duas vezes por semana.

### 3.2. Procedimentos experimentais

Após o período de aclimação os animais foram divididos em dois grupos experimentais e submetidos durante 24, 72 e 144 horas ao estresse hiposmótico (salinidade de 0‰) ou hiperosmótico (salinidade de 34‰), os outros parâmetros

foram mantidos nas mesmas condições de aclimação e os caranguejos foram alimentados até 16 horas antes de serem utilizados nos experimentos.

Ao final dos períodos experimentais, os caranguejos foram crioanestesiados e amostras de 50-100mg de brânquias (anteriores e posteriores), de músculo da mandíbula e de hepatopâncreas foram coletadas e colocadas em placas de Petry sobre gelo, contendo solução fisiológica de caranguejo (SFC). Foram feitos pequenos cortes nas lamelas das brânquias, possibilitando um maior contato do tecido com o meio de incubação. As brânquias foram divididas em anteriores e posteriores, pois apresentam funções distintas, estando as anteriores relacionadas com a respiração e as posteriores com o processo osmorregulatório (Luquet *et al.*, 2000; Bianchini *et.al.*, 2008).

Os animais mantidos no tanque, contendo água com salinidade de 20‰, constituíram o grupo controle e foram sacrificados juntamente com os animais dos grupos submetidos ao estresse osmótico.

### **3.3. Determinação da conversão de $^{14}\text{C}$ -glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios**

As amostras de tecido foram colocadas em tubos de 2ml com 250 $\mu\text{l}$  de SFC contendo:

1) Grupo controle: 374mM de NaCl, 10mM KCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 8,8mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10mM HEPES e 0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), pH 7,8, 770 mOsm/kg. A osmolalidade da hemolinfa dos animais aclimatados à salinidade de 20‰ é de  $719 \pm 10,41$  mOsm/kg.

2) Grupo hiposmótico: 331mM de NaCl, 10mM KCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 8,8mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10mM HEPES e 0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil

(PMSF), pH 7,8, 690 mOsm/kg. A osmolalidade da hemolinfa dos animais aclimatados à salinidade de 0‰ é de  $636 \pm 21,5$  mOsm/kg.

3) Grupo hiperosmótico: 457mM de NaCl, 10mM KCl, 25mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 8,8mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 10mM HEPES e 0,1mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), pH 7,8, 900 mOsm/kg. A osmolalidade da hemolinfa de *N. granulata* aclimatado à 34‰ é de  $853 \pm 12.45$  mOsm/kg.

Ao meio da incubação dos três grupos experimentais (controle, estresse hiposmótico e hiperosmótico) foi adicionado 0,2μCi de [U-<sup>14</sup>C]glicina (104mCi mmol<sup>-1</sup>, Amersham International) e 5mM de glicina não marcada. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff por 1 hora sob agitação constante a 25°C.

Após a incubação, os tubos foram imediatamente colocados no gelo, para parar as reações bioquímicas. Os tecidos foram lavados com SFC, para retirar o excesso de material radioativo, e secos em papel filtro. Em seguida as amostras foram homogeneizadas em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v), utilizando-se um homogeneizador com pistilo de teflon, e armazenadas para posterior extração dos lipídios.

A extração dos lipídios foi realizada conforme o método descrito por Folch *et al.* (1957). Às amostras filtradas foi adicionada solução salina (0,9%) na proporção de 5:1 (v/v). Após a centrifugação por 5 minutos a 1500rpm, a fase superior foi descartada e amostras de 2ml foram repassadas para tubos de vidro, que foram deixados em repouso dentro de uma capela de exaustão, a temperatura ambiente, até a evaporação completa da fase clorofórmica sob nitrogênio. Às amostras foram acrescentados 5ml de líquido de cintilação [Tolueno - PPO (0,4%) e POPOP

(0,01%)] e a radioatividade medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos em nmol de  $^{14}\text{C}$ -glicina convertida em  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais  $\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido $\cdot\text{h}^{-1}$  de incubação.

### **3.4. Determinação da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK (E.C. 4.1.1.32))**

A determinação da atividade da PEPCK foi realizada segundo a técnica descrita por Oliveira e Da Silva (1997), baseado na reação de troca entre  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  e o oxalacetato.

As amostras de tecidos (cerca de 500mg) de caranguejos dos diferentes grupos experimentais foram homogeneizadas em sacarose 0,25M mais fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) na proporção de 0,5:3:0,003 (w/v/v), com a utilização de um homogeneizador com pistilo de teflon. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 600xg por 10 minutos a temperatura de 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo que foi mantido em gelo.

A mistura da reação (500 $\mu\text{l}$ ) continha tampão Tris-HCl 0,625M, oxalacetato (OAA) 0,3M,  $\text{MnCl}_2$  0,04M,  $\text{MgCl}_2$  0,4M, GSH 6,25M, trifosfato de inosina (ITP) 0,02M,  $\text{NaHCO}_3$  1M e 0,4 $\mu\text{Ci}$  de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  (8,4mCi/mmol – Du Pont). A essa mistura foram adicionados 50 $\mu\text{l}$  de amostra e realizada a incubação em banho metabólico a 37°C durante 4 minutos. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 500 $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) 5%. As amostras foram imediatamente aeradas com  $\text{CO}_2$  durante 5 minutos para remoção do excesso de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ . Após, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm durante 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 300 $\mu\text{l}$  e repassados para os tubos de vidro contendo 3ml de líquido

de cintilação [Tolueno-Triton X-100 (2:1) - PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac).

Para cada grupo experimental foi preparado um branco. Os brancos contêm todos os componentes da mistura (inclusive a amostra), exceto ITP (ativador enzimático). As contagens obtidas dos brancos eram descontadas das contagens das amostras e os resultados da atividade foram expressos em  $\mu\text{mol de H}^{14}\text{CO}_3^-$  incorporado em oxalacetato. $\text{mg}^{-1}$  de proteína. $\text{min}^{-1}$  de incubação.

### **3.5. Determinação de proteínas**

A determinação da concentração de proteínas totais nos tecidos foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976) e como padrão foi utilizada albumina bovina.

### **3.6. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão da média (média  $\pm$  DPM). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, com teste de comparação Sudent-Newman-Keuls (SNK). Os dados foram considerados significativos quando  $P < 0,05$ . O testes foram realizados com o programa estatístico SigmaStat 3.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Estudo *in vitro* da incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais e determinação da atividade da PEPCK nas brânquias anteriores em *Neohelice granulata* submetidos ao estresse hiper ou hiposmótico

A medida da conversão de  $^{14}\text{C}$ -glicina em  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais, nas brânquias anteriores de animais submetidos a diferentes tempos de estresse osmótico, pode ser vista na figura 4 A.

Nas brânquias anteriores de caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico, constata-se um aumento de 3,5 vezes ( $p < 0,05$ ) na síntese de lipídios- $^{14}\text{C}$  às 72 horas de estresse, com uma diminuição de 27% no tempo de 144 horas. Nas brânquias anteriores de animais previamente submetidos ao estresse hiperosmótico, verifica-se uma diminuição de 52% na capacidade lipogênica entre os tempos de 72 e 144 horas de estresse.

A atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), medida através da incorporação de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  em oxalacetato, nas brânquias anteriores de animais submetidos a diferentes tempos de estresse osmótico pode ser vista na figura 4 B.

Durante o estresse hiperosmótico, observa-se um aumento linear ( $r^2 = 0,99$ ) na atividade da PEPCK. Entretanto, em animais submetidos ao estresse hiposmótico, constata-se uma diminuição de 65% na atividade da PEPCK no tempo de 24 horas e, posteriormente, um aumento de cerca de 6 vezes no tempo de 72 horas, mantendo-se até o final do período experimental.



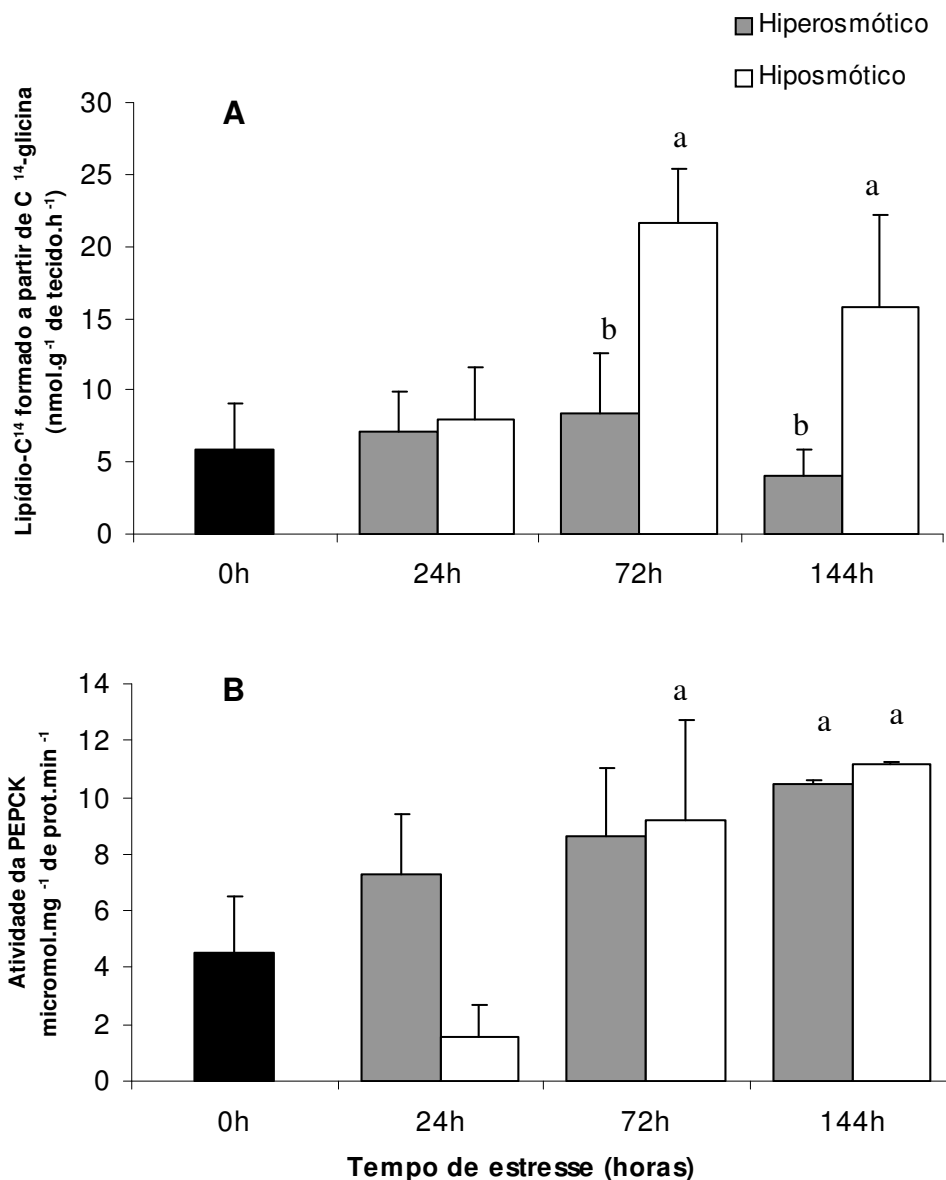


Figura 4: Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de <sup>14</sup>C-glicina em <sup>14</sup>C-lipídios totais (A) (n=6-24) e sobre a atividade da enzima PECK (B) (n=6-12), nas brânquias anteriores de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DPM.

<sup>a</sup> - valores médios diferentes do grupo controle (0h) (p<0,05).

<sup>b</sup> - valores médios diferentes entre tempos do mesmo grupo experimental (p<0,05).

#### **4.2. Estudo *in vitro* da incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais e determinação da atividade da PEPCK nas brânquias posteriores em *Neohelice granulata* submetidos ao estresse hiper ou hiposmótico**

A medida da incorporação da  $^{14}\text{C}$ -glicina em lipídios totais em brânquias posteriores de animais submetidos ao estresse hiper ou hiposmótico pode ser vista na figura 5 A.

Nas brânquias posteriores de *N. granulata*, submetidos tanto ao estresse hiperosmótico como no hiposmótico, constata-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na formação de lipídio- $^{14}\text{C}$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina às 72 horas de estresse, retornando aos valores do grupo controle às 144 horas.

Na figura 5 B pode ser vista a atividade enzimática da PEPCK nas brânquias posteriores de animais submetidos a diferentes tempos de estresse osmótico.

Nas primeiras 24 horas de estresse hiperosmótico, observa-se um aumento de 5,5 vezes ( $p < 0,05$ ) na atividade da PEPCK. Essa atividade diminui cerca de 3 vezes ( $p < 0,05$ ), mas mantém-se aumentada ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle até o final do período experimental. Nos caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico, a atividade da PEPCK diminui cerca de 50% ( $p < 0,05$ ) no tempo de 24 horas, retornando aos níveis próximos do grupo controle às 72 horas. No final do período experimental novamente constata-se uma diminuição ( $p < 0,05$ ) na atividade dessa enzima.

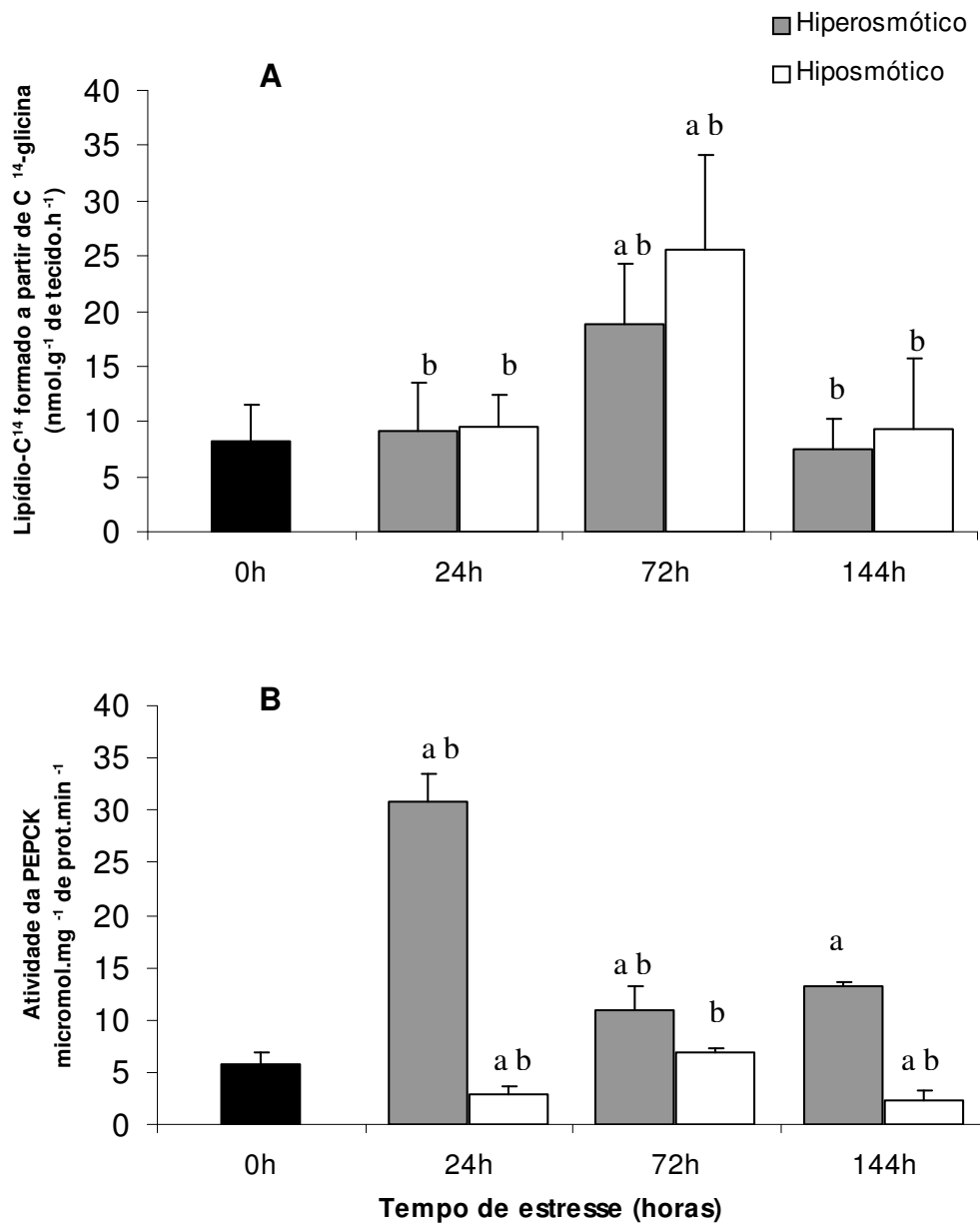


Figura 5: Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de <sup>14</sup>C-glicina em <sup>14</sup>C-lipídios totais (A) (n=7-19) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B) (n=6), nas brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DPM.

<sup>a</sup> - valores médios diferentes do grupo controle (0h) (p<0,05).

<sup>b</sup> - valores médios diferentes entre tempos do mesmo grupo experimental (p<0,05).

### **4.3. Estudo *in vitro* da incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais e determinação da atividade da PEPCK no músculo da mandíbula em *Neohelice granulata* submetidos ao estresse hiper ou hiposmótico**

Na figura 6 A está representada a medida da incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicina em lipídios totais, no músculo da mandíbula de animais submetidos a diferentes tempos de estresse osmótico.

Durante o estresse hiperosmótico, verifica-se um aumento de cerca de 44% ( $p < 0,05$ ) na incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicina em lipídios totais ao final do período (144h) de tratamento. Nos animais submetidos ao estresse hiposmótico, também é possível observar um aumento na síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais neste mesmo tempo de estresse.

A atividade da enzima PEPCK no músculo da mandíbula de animais submetidos ao estresse osmótico está representada na figura 6 B.

Durante o choque hiperosmótico, observa-se uma diminuição de 42% na atividade da PEPCK nas primeiras 24 horas, retornando aos valores do grupo controle às 72 horas e diminuindo a atividade em 66% ( $p < 0,05$ ) no final do período experimental. Nos animais submetidos ao estresse hiposmótico, constata-se um aumento na atividade enzimática da PEPCK no tempo de 72 horas e, posteriormente, uma diminuição de 58% no tempo de 144 horas de estresse.

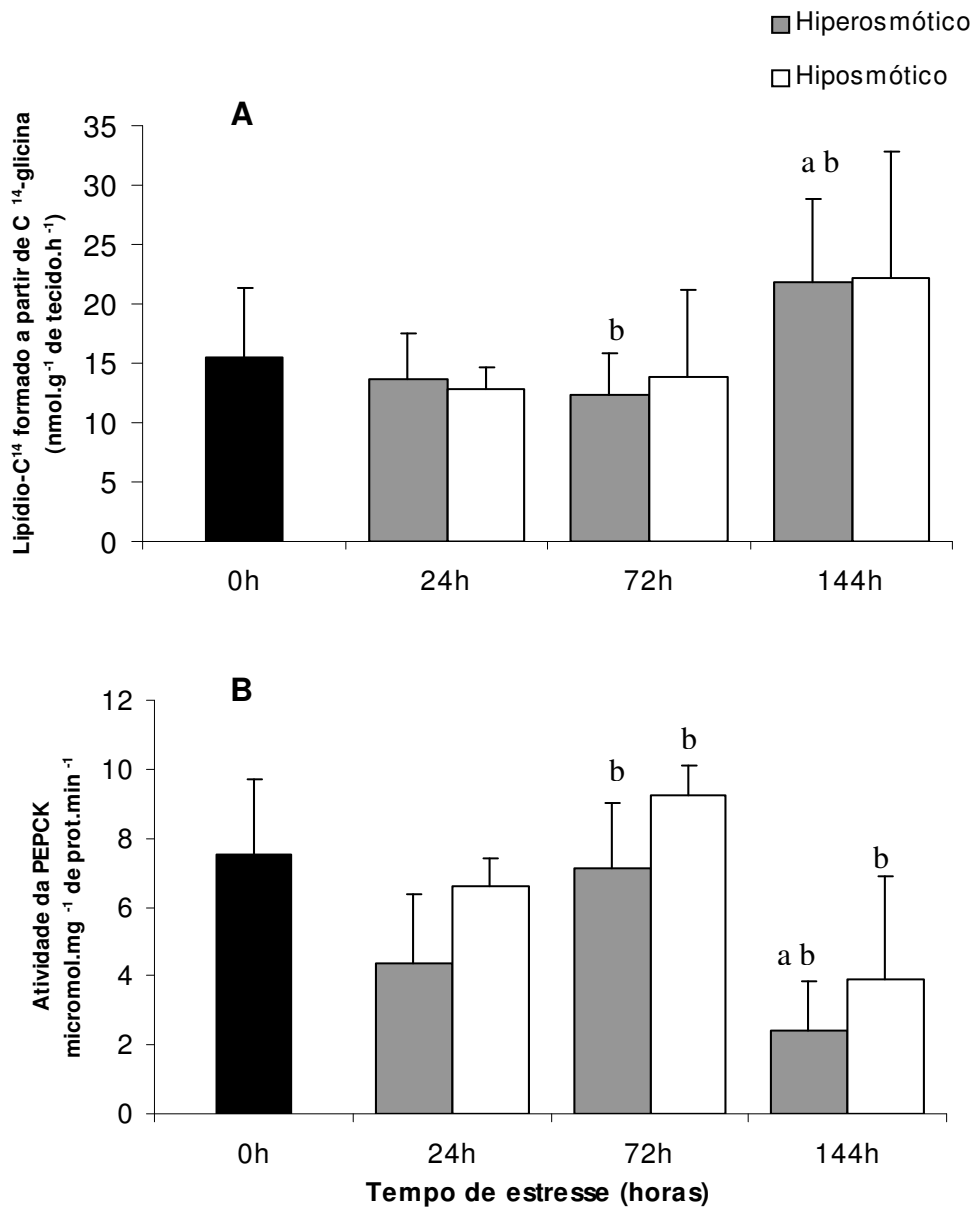


Figura 6: Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de <sup>14</sup>C-glicina em <sup>14</sup>C-lipídios totais (A) (n=6-15) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B) (n=6-12), no músculo da mandíbula de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DPM.

<sup>a</sup> - valores médios diferentes do grupo controle (0h) (p<0,05).

<sup>b</sup> - valores médios diferentes entre tempos do mesmo grupo experimental (p<0,05).

#### **4.4. Estudo *in vitro* da incorporação do $^{14}\text{C}$ da glicina em $^{14}\text{C}$ -lipídios totais e determinação da atividade da PEPCK no hepatopâncreas em *Neohelice granulata* submetidos ao estresse hiper ou hiposmótico**

O efeito de diferentes tempos de estresse hiper ou hiposmótico, sobre a incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicina em lipídios totais no hepatopâncreas, está representado na figura 7 A.

Durante o estresse hiperosmótico, o hepatopâncreas apresenta uma diminuição de 43% ( $p < 0,05$ ) na síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais nas primeiras 24 horas de estresse, com um aumento ( $p < 0,05$ ) de cerca de 2,5 vezes às 72 horas e retornando aos valores próximos do grupo controle no tempo de 144 horas. Nos animais submetidos ao estresse hiposmótico, após uma diminuição ( $p > 0,05$ ) no primeiro dia de estresse, a formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina retornou aos valores do grupo controle a partir das 72 horas.

Na figura 7 B pode ser vista a atividade da enzima PEPCK no hepatopâncreas de animais submetidos a diferentes tempos de estresse osmótico.

Nos animais submetidos ao estresse hiposmótico, observa-se um aumento linear ( $r^2 = 0,95$ ) na atividade da PEPCK. Entretanto, em animais submetidos ao estresse hiperosmótico, constata-se um aumento ( $p < 0,05$ ) de 2,6 vezes na atividade da PEPCK no tempo de 24 horas e, posteriormente, um retorno aos valores do grupo controle às 72 horas de estresse, aumentando novamente ( $p < 0,05$ ) a atividade enzimática ao final do período experimental.

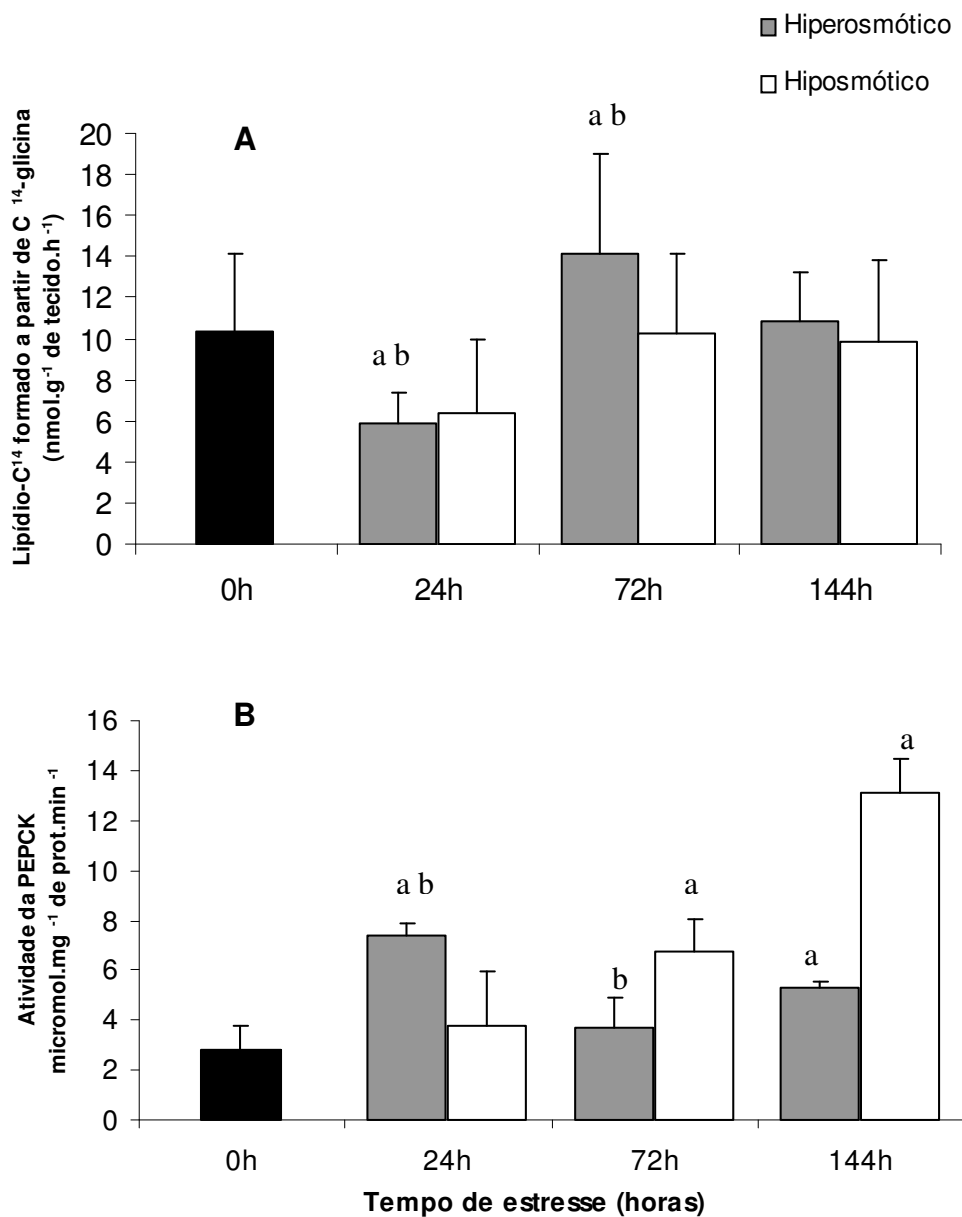


Figura 7: Efeito de diferentes tempos de estresse hiperosmótico ou hiposmótico sobre a conversão de  $^{14}C$ -glicina em  $^{14}C$ -lipídios totais (A) (n=6-18) e sobre a atividade da enzima PEPCK (B) (n=6-12), no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias  $\pm$  DPM.

<sup>a</sup> - valores médios diferentes do grupo controle (0h) ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> - valores médios diferentes entre tempos do mesmo grupo experimental ( $p < 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Schein (1999) verificou que durante o estresse hiperosmótico, a concentração do aminoácido glicina na hemolinfa de *N. granulata* diminui cerca 60%. A redução na concentração da glicina na hemolinfa estaria envolvida no processo de aclimatação do *N. granulata* ao estresse osmótico, aumentando a concentração intracelular de aminoácidos em resposta ao choque hiperosmótico. Schein *et al.* (2005 b) demonstraram que a captação de aminoácidos aumenta significativamente no músculo e no hepatopâncreas de *N. granulata* submetido ao estresse hiperosmótico. Os autores também mostraram que a oxidação de aminoácidos no hepatopâncreas seria uma das estratégias metabólicas para aumentar a concentração de aminoácidos livres intracelulares durante o processo de aclimatação ao meio hiperosmótico (Schein *et al.*, 2005 b). Também a participação da via gliconeogênica no processo de aclimatação ao estresse osmótico foi demonstrada no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias de *N. granulata* (Oliveira e Da Silva, 2000; Schein *et al.*, 2004; 2005; Chittó *et al.*, 2008 a; b).

Em *N. granulata*, Schein *et al.* (2004) realizaram a clonagem molecular da PEPCK do músculo mandibular e verificaram a expressão desta enzima nas brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas, no sistema nervoso e no coração. A atividade da PEPCK no hepatopâncreas e no músculo mandibular é cerca de 80-95% mitocondrial (Oliveira e da Silva, 1997; Schein *et al.*, 2004; 2005 a). Contudo, nas brânquias anteriores e posteriores a atividade dessa enzima está dividida entre as frações citosólica (32-36%) e mitocondrial (66-68%) (Chittó *et al.*, 2008 b).

O tecido branquial de braquiúros osmorreguladores apresenta uma diferenciação funcional e estrutural. Os três pares de brânquias posteriores constituem o



principal sítio osmorregulador, enquanto os três anteriores estão mais associados à função respiratória e excreção de amônia (Bianchini *et al.*, 2008; Péqueux, 1995; Freire *et al.*, 2008 b).

No presente trabalho, em brânquias anteriores de caranguejos expostos ao meio hiperosmótico não foram observadas alterações significativas na síntese de lipídios em relação aos animais do grupo controle (Figura 4A). Os aminoácidos tissulares (arginina, alanina, glicina, prolina, ácido glutâmico e taurina entre outros) são considerados os principais efetores orgânicos osmoticamente ativos em crustáceos, contribuindo com cerca de 50% da pressão osmótica intracelular (Gilles e Delpire, 1997). Durante a aclimação ao meio hiperosmótico a concentração de aminoácidos intracelulares aumenta com objetivo de limitar a alteração do volume celular. Desta forma, a ativação da síntese de lipídios a partir de aminoácidos comprometeria a regulação isosmótica do fluido intracelular, pois diminuiria a concentração de osmólitos orgânicos nas células branquiais. Bock (2005) verificou uma diminuição na capacidade de síntese de proteínas nas brânquias anteriores às 72 horas de estresse hiperosmótico.

Contudo, no presente trabalho, a atividade da PEPCK nas brânquias anteriores apresenta um aumento linear ( $r^2=0,99$ ) ao longo do estresse hiperosmótico (Figura 4B). Estudos prévios, realizados em brânquias anteriores deste mesmo caranguejo, mostraram que a incorporação de  $^{14}\text{C}$ -alanina em  $^{14}\text{C}$ -glicose diminuiu significativamente às 24 horas de estresse hiperosmótico, retornando a valores semelhantes àqueles verificados no grupo controle entre 72-144 horas de estresse osmótico (Chittó *et al.*, 2008 b). Esta redução na capacidade de síntese de glicose a partir de aminoácidos às 24 h de estresse osmótico foi acompanhada por uma diminuição significativa de cerca de 55% na atividade da PEPCK citosólica (Chittó

*et al.*, 2008 b). No presente trabalho foi determinada a atividade total da enzima PEPCK, o que possivelmente mascarou a redução da atividade citosólica às 24h de estresse hiperosmótico. Porém, o aumento da atividade total da PEPCK entre 72-144h de estresse hiperosmótico, constatado no presente estudo, corrobora com o retorno da capacidade de síntese de glicose, a partir de aminoácidos, constatada por Chittó *et al.* (2008 b) nesse mesmo período experimental. A redução, de cerca de 40% (não significativa), na incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicina em lipídios totais em brânquias anteriores às 144h de estresse hiperosmótico poderia ser interpretada como um desvio desse aminoácido para a via gliconeogênica, reforçado pelo aumento nos valores de glicose hemolinfática neste período experimental (Chittó, 2000).

Durante o choque hiposmótico, a partir das 72h de estresse, constata-se um aumento significativo na atividade da enzima PEPCK em brânquias anteriores, que coincide com o aumento da síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina (Figura 4). Assim, o aumento na síntese de lipídios, que perdura até o término dos seis dias (144h) de estresse hiposmótico, diminuiria as concentrações intracelulares de aminoácidos, contribuindo para o ajuste metabólico em resposta à exposição dos animais ao meio diluído. Chittó *et al.* (2008 b) não verificaram, durante o choque hiposmótico, alteração na atividade gliconeogênica a partir de  $^{14}\text{C}$ -alanina em *N. granulata* submetido durante o mesmo tempo experimental ao estresse hiposmótico. Também o aumento significativo na incorporação da  $^{14}\text{C}$ -glicina em lipídios totais nas brânquias posteriores de caranguejos submetidos durante 72 horas ao estresse hiperosmótico foi precedido (às 24h) pelo aumento, de cerca de cinco vezes, na atividade da PEPCK (Figura 5). Apesar da diminuição observada a partir das 72 horas de estresse, a atividade dessa enzima manteve-se cerca de 50%

mais elevada que àquela verificada no grupo controle. Em *N. granulata* submetido ao estresse hiperosmótico, durante os meses de verão, a concentração de lipídios totais nas brânquias posteriores diminui significativamente no período compreendido entre 72 e 144 horas de choque osmótico e coincide com a redução significativa da incorporação de  $^{14}\text{C}$ -glicerol em glicose (Chittó *et al.*, 2008 a). Os achados do presente trabalho sugerem que tanto em brânquias anteriores de caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico como em brânquias posteriores de animais expostos ao meio hiperosmótico haveria a participação da via gliceroneogênica na aclimação aos respectivos estresses osmóticos. Assim, para manter o ciclo triacilglicerol/ácido graxo e/ou reduzir a concentração de aminoácidos livres intracelulares nas brânquias anteriores e posteriores, a formação de glicerol 3-fosfato seria às expensas de aminoácidos via gliceroneogênese. Corroborando com esta hipótese, nas brânquias anteriores e posteriores ocorrem as duas isoformas da enzima PEPCK, a citosólica e a mitocondrial, diferentemente dos outros tecidos de *N. granulata*, tais como o músculo e o hepatopâncreas, em que a atividade da PEPCK é cerca de 90% mitocondrial (Oliveira e Da Silva, 1997; Schein *et al.*, 2004).

A participação da enzima PEPCK citosólica na gliceroneogênese foi demonstrada em mamíferos (Croniger *et al.*, 2002; Hanson e Reshef, 2003; Reshef *et al.*, 2003; Beale *et al.*, 2002; Hanson, 2005). Olswang *et al.* (2002) verificaram que camundongos geneticamente modificados, nos quais a PEPCKc não era expressa no tecido adiposo, apresentavam quantidades reduzidas de gordura corporal. Por outro lado, a superexpressão desta enzima resultava em animais obesos (Frankhauser *et al.*, 2002).

Além disso, no período de aclimação ao laboratório e ao estresse osmótico, os caranguejos foram alimentados com carne bovina crua, isto é, uma dieta rica

em proteínas. Em ratos alimentados com dieta rica em proteínas a atividade da gliceroneogênese nos tecidos adiposos branco e marrom é significativamente maior que aquela verificada nos animais alimentados com dieta balanceada (Botion *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1999). Contudo, para a confirmação da participação da gliceroneogênese no ajuste metabólico durante o estresse hiposmótico serão necessárias medidas das atividades das enzimas PEPCK citosólica e piruvato quinase e experimentos de incorporação de piruvato-2-<sup>14</sup>C em glicerol 3-fosfato.

No presente estudo, em brânquias posteriores de caranguejos submetidos ao choque hiposmótico constata-se uma diminuição significativa na atividade da PEPCK às 24 e 144 horas de estresses (Figura 5B). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Chittó *et al.* (2008 b) que constataram às 72 horas de estresse hiposmótico uma significativa diminuição da incorporação de <sup>14</sup>C-alanina em glicose em brânquias posteriores de *N. granulata* submetido aos mesmos tempos de estresse. Contudo, os valores de incorporação de <sup>14</sup>C-glicina em lipídios totais aumentam marcadamente às 72 horas de estresse hiposmótico em brânquias posteriores (Figura 5A). Durante o choque hiposmótico o tecido deve reduzir a concentração de aminoácidos livres intracelulares, assim, os átomos de carbono dos aminoácidos seriam convertidos à acil-CoA, diretamente ou via fosfoenolpiruvato, e a acil-CoA produzida proveria de precursores a via de síntese de ácido graxo. Como consequência da diminuição na concentração de aminoácidos livres intracelulares, ocorreria uma redução da atividade gliconeogênica em brânquias posteriores em resposta a aclimatação ao meio hiposmótico.

Os efeitos do estresse hiposmótico e hiperosmótico sobre o metabolismo lipídico do músculo da mandíbula só foram observados no sexto (144h) dia de tratamento, quando se constata um aumento significativo de cerca de 44% da lipogê-

nese a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina (Figura 6A). A diminuição da concentração intracelular de aminoácidos intracelulares, durante o estresse hiposmótico, seria uma das estratégias para a regulação do volume celular utilizada em tecidos de crustáceos (Gilles e Delpire, 1997). Nesse mesmo tempo de estresse hiposmótico, foi observado por Schein *et al.* (2005 b) que a oxidação e a captação de aminoácidos não sofreram alterações significativas no músculo de *N. granulata*. Já a síntese de glicose a partir de aminoácidos, neste mesmo tecido, aumenta significativamente às 24h de choque hiposmótico, contudo, no período de 72-144h de tratamento os valores de gliconeogênese foram semelhantes àqueles verificados no grupo controle (Schein *et al.*, 2005 a). Nesse mesmo tempo de estresse hiposmótico, Bock (2005) observou aumento na síntese de proteínas, estratégia que também contribuiria para a diminuição da concentração de aminoácidos do meio intracelular. Assim o aumento da síntese de lipídios a partir de aminoácidos no músculo mandibular seria uma das estratégias metabólicas para regular o volume celular em período mais tardio de aclimação ao meio hiposmótico, quando os valores de gliconeogênese retornam a valores semelhantes aqueles do grupo controle (Schein *et al.*, 2005 a). Entretanto, a atividade da enzima PEPCK não acompanhou o perfil do metabolismo lipídico e, inclusive, apresentou uma diminuição de cerca de 47% no último dia de tratamento em relação aos animais do grupo controle, sugerindo que a redução no fluxo de aminoácidos no tecido estaria controlando a atividade da enzima (Figura 6).

No presente trabalho, às 144 horas de aclimação ao meio hiperosmótico, constata-se uma redução de 57% da atividade da PEPCK acompanhada por um aumento marcante na síntese de lipídios totais a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina (Figura 6). Também em músculo mandibular de *N. granulata*, submetido ao estresse hiperos-

mótico, foi verificado aumento significativo na captação de aminoácidos às 9, 12 e 24 horas, seguido de diminuição na capacidade gliconeogênica a partir de aminoácidos e diminuição na atividade da enzima PEPCK mitocondrial e citosólica (Waché, 2003; Schein *et al.*, 2005). Desta forma, os resultados do presente trabalho sugerem que o aumento na síntese de lipídios a partir de aminoácidos, às 144h, seria uma estratégia de ajuste na concentração intracelular de aminoácidos após a aclimação ao meio hiperosmótico. Recentemente, foi verificado que a concentração de lipídios totais no músculo mandibular diminui significativamente durante o estresse hiperosmótico (Chittó *et al.*, 2008 a), assim o aumento na síntese de lipídios a partir de aminoácidos também serviria para repor as reservas energéticas utilizadas durante o esforço de regulação osmótica.

No tecido hepatopancreático, a exposição dos caranguejos por 24 horas ao meio hiperosmótico promove um aumento na atividade da enzima PEPCK, contudo, a síntese de lipídios a partir de <sup>14</sup>C-glicina diminui significativamente no mesmo período experimental (Figura 7). Nesse mesmo período de choque hiperosmótico foi constatado aumento na captação e diminuição na oxidação de aminoácidos no hepatopâncreas (Schein *et al.*, 2005 a; b). Esses parâmetros metabólicos foram determinados às 24 h de estresse hiperosmótico. Estudo realizado por Waché (2003) mostrou que a captação de aminoácidos ocorre a partir das 9 horas de exposição ao meio salino. Assim, o aumento da atividade da PEPCK constatado no presente trabalho (às 24 e 144 horas) seria uma consequência do incremento na concentração de aminoácidos livres intracelulares e do ajuste do volume celular ocorrido antes das 24 horas. Como o hepatopâncreas é um órgão metabólico importante para a resposta ao estresse, os ajustes metabólicos estratégicos para a aclimação ao estresse osmótico ocorreriam temporalmente mais rapidamente

que nos outros tecidos como, por exemplo, no músculo. O aumento na síntese de lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina às 72 horas de estresse hiperosmótico e o retorno da atividade da PEPCK a valores semelhantes àqueles verificados no grupo controle, corroboram com a hipótese de que um ajuste metabólico mais rápido ocorreria no hepatopâncreas.

Nos caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico, a lipogênese não seria uma das rotas envolvidas no ajuste metabólico para regulação do volume celular no hepatopâncreas, pois os valores mantiveram-se próximos aos do grupo controle durante todo o período de exposição dos animais ao meio diluído (Figura 7A).

O aumento linear ( $r^2=0,95$ ) da atividade da PEPCK no hepatopâncreas de caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico pode ser explicado pelo aumento da atividade gliconeogênica (Figura 7B). Neste mesmo tecido, Oliveira e Da Silva (2000) verificaram aumento significativo da incorporação de  $^{14}\text{C}$ -alanina em glicose e da atividade da PEPCK nos mesmos tempos de estresse hiposmótico utilizados no presente estudo. Desta forma, a gliconeogênese a partir de aminoácidos durante a aclimação ao choque hiposmótico diminuiria a concentração intracelular de compostos nitrogenados. As autoras ainda demonstraram neste mesmo estudo um aumento nas concentrações de uréia na hemolinfa, sugerindo um aumento no catabolismo de aminoácidos e, com isso, diminuição nas concentrações intracelulares destes compostos durante o ajuste ao estresse hiposmótico.

## 6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que a síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina seria uma via metabólica que participaria do ajuste de aminoácidos intracelulares durante o processo de aclimação ao estresse osmótico em *Neohelice granulata*. Nas brânquias anteriores (estresse hiposmótico) e posteriores (estresse hiperosmótico) provavelmente o aumento na incorporação da  $^{14}\text{C}$ -glicina ocorreria via gliceroneogênese. Nestes órgãos a atividade da PEPCK ocorre tanto na fração citosólica como na mitocondrial, o que permitiria a conversão da glicina em glicerol, mantendo, assim, o ciclo triacilglicerol/ácido graxo nesses tecidos. Contudo, estudos mais aprofundados sobre a via gliceroneogênica em *N. granulata* serão necessários para confirmar estes resultados.

Nas brânquias posteriores (no estresse hiposmótico), no músculo e no hepatopâncreas a síntese de lipídios através da formação de ácidos graxos a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicina seria uma via de ajuste de concentração de aminoácidos livres intracelulares durante a aclimação ao estresse osmótico.

A figura 8 sintetiza os trabalhos realizados no Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada/UFRGS, apresentando as vias metabólicas envolvidas no fluxo de aminoácidos livres tissulares em caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse osmótico.



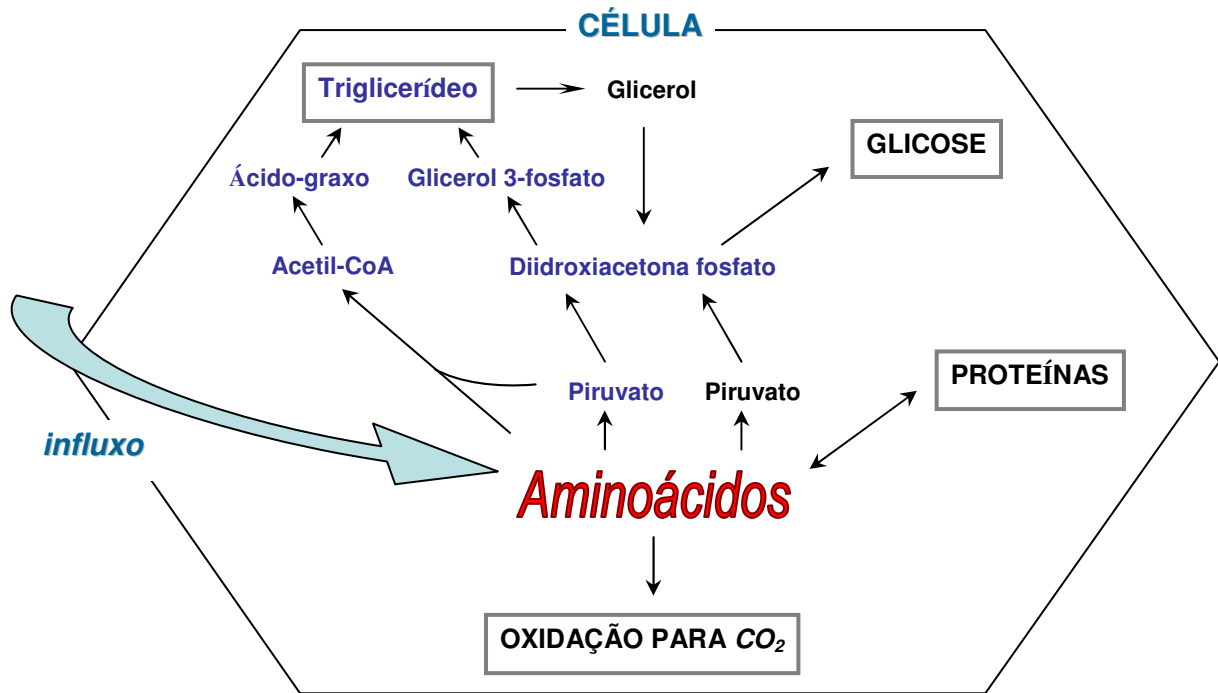


Figura 8: Vias metabólicas envolvidas no fluxo de aminoácidos livres tissulares na regulação osmótica em *N. granulata*. Em azul: contribuição do presente trabalho para a compreensão da via lipogênica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, C.E.; TYLER, P.A.; VARNEY, M.S. (2000). Lipid profiles of *Nematocarcinus gracilis* a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. **Hydrobiologia**. 440: 273-279.

BEALE, E.G.; HAMMER, R.E.; ANTOINE, B.; FOREST, C. (2002). Glyceroneogenesis comes of age. **FASEB J.** 16: 1695-1696.

BIANCHINI, A.; LAUER, M.M.; NERY, L.E.M.; COLARES, E.P.; MONSERRAT, J.M.; SANTOS, E.A. (2008). Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. **Comp. Biochem. Physiol.** A. Disponível em: <10.1016/j.cbpa.2007.12.001>.

BOCK, C.L. (2005). Influência do estresse hipo e hiperosmótico na síntese e mobilização de proteínas, na captação e oxidação de aminoácidos em tecidos de *Chasmagnathus granulata*. **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

BOND-BUCKUP, G; FONTOURA, N.F.; MARRONI, N.P.; KUCHARSKI, L.C. (1991) O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia. Editora da Universidade – UFRGS, Porto Alegre, 71p.

BOSCHI, E.E. (1964). Los crustáceos decápodos Brachyura Del litoral bonaerense (R. Argentina). **Bol. Inst. Biol. Mar.**, Mar Del Plata (Argentina). 6: 1-99.

BOTION, L.M.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. (1995) Increased adipose tissue glyceroneogenesis in rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. **Horm. Metab. Res.** 27: 310-313.

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

BRITO, M.N.; BRITO, N.A.; BRITO, S.R.; MOURA, M.A.; KAWASHITA, N.H.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. (1999). Brown adipose tissue triacylglycerol synthesis in rats adapted to a high-protein, carbohydrate-free diet. **Am. J. Physiol.** 276: R1003-R1009.

BROMBERG, E. (1992) Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão. **Dissertação de Mestrado**, FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande), Rio Grande, RS, Brasil.

CHITTÓ, A.L.F. (2000). Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

CHITTÓ, A.L.F.; SCHEIN, V.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. (2008a). Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of *Neohelice granulata* crabs challenged by a change in external salinity. **Invertebrate Biol.** *In Press*.

CHITTÓ, A.L.F.; SCHEIN, V.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. (2008b). Gills gluconeogenesis during osmotic stress in *Neohelice granulata* crabs. **Comp. Biochem. Physiol.** *Submitted*.

CRONIGER, C.M.; OLSWANG, Y.; RESHEF, L.; KALHAN, S.C.; TILGHMAN, S.M.; HANSON, R.W. (2002). Phosphoenolpyruvate carboxykinase revisited. **Biochem. Mol. Biol. Educ.** 30 (1): 14-20.

DA SILVA, R.S.M.; KUCHARSKI, L.C.R. (1992). Effect of Hyposmotic Stress on the Carbohydrate Metabolism of Crabs Maintained on High Protein or Carbohydrate-Rich Diet. **Comp. Biochem. Physiol.** 101A (3): 631-634.

DEVLIN, T.M. (2002). Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. Tradução de Iara M. Michelacci. 4 ed. São Paulo: editora Edgar Blücher, 2002.

DIAS, G.S. (1996). Estudo da gliconeogênese no manto e no hepatopâncreas do gastrópoda pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongus* (Muller, 1974). **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

DIAS, G.S. (2000). Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no gastrópoda pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongus*. **Tese de Doutorado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

DRACH, F.; TCHERNIGOVTZEFF, C. (1967). Sur la methode de determination des stades d'intermue et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu**. 161: 595-607.

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

FERREIRA, B.D.; HACK, C.; OLIVEIRA, G.T.; BOND-BUCKUP, G. (2005). Perfil metabólico de *Aegla platensis* Schmitt, (Crustacea, Aeglidae, Anomura) submetida a dietas ricas em carboidratos ou proteínas. **Revista Brasileira de Zoologia**. 22: 161-168.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, H.S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**. 226: 497-503.

FRANKHAUSER, S.; MUÑOZ, S.; PUJOL, A.; CASELLAS, A.; RIU, E.; OTAEGUI, P.; SU, B.; BOSCH, F. (2002). Increased fatty-acid re-esterification by

PEPCK overexpression in adipose tissue leads to obesity without insulin resistance. **Diabetes**. 51: 624-630.

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

FREIRE, C.A.; AMADO, E.M.; SOUZA, L.R.; VEIGA, M.P.T.; VITULE, J.R.S.; SOUZA, M.M; PRODOCIMO, V. (2008a). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. **Comp. Biochem. Physiol.** 149: 435-446.

FREIRE, C.A.; ONKEN, H.; McNAMARA, J.C. (2008b). A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. **Comp. Biochem. Physiol.** 151: 272-304.

GARCIA, C.F.; GONZALEZ-BARO, H.; POLLERO, R. (2002). Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. **Lipids**. 37(6): 581-585.

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

GILLES, R. (1987). Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. **Current Topics in Membranes and Transport**. 30: 205-248.

GILLES, R. (1997) "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 117A: 279-290.

GILLES, R. (1998). Organic 'compensatory' osmolytes in osmolarity control and hydration changes in animal cells. **S. Afr. J. Zool.** 33: 76-86.

GILLES, R.; DELPIRE, E. (1997). Variations in salinity, osmolarity and water availability: vertebrates and invertebrates. In: Dantzler, W.H.(Ed.), **Handbook of Comparative Physiology**. Vol. II. Oxford University Press, New York: 1523-1586.

HANSON, R.W. (2005). Metabolism in the era of molecular biology. **J. Biol. Chem.** 280 (3): 1705-1715.

HANSON, R.W.; RESHEF, L. (2003). Glyceroneogenesis revisited. **Biochimie.** 85: 1199-1205.

JAHN, M.P.; CAVAGNI, G.M.; KAISER, D; KUCHARSKI, L.C. (2006) Osmotic effect of choline and glycine betaína on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 334: 1-9.

KILBERG, M.S.; HÄUSSINGER, D. (1992). Mammalian aminoacid transport: mechanism and control. **Plenum Press**. N.Y. pp 3-49.

KUCHARSKI, L.C.R. (1990). Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata*. **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

KUCHARSKI, L.C.R.; DA SILVA, R.S.M. (1991). Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.** 99A: 215-218.

LUQUET, C.M.; ROSA, G.A; FERRARI, C.C.; GENOVESE, G.; PELLERANO, G.N. (2000). Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. **Crustaceana.** 73: 53-67.

LUVIZZOTTO-SANTOS, R.; LEE, J.T.; BRANCO, Z.P.; BIANCHINI, A.; NERY, L.E.M. (2003). Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea - Grapsidae). **J. Exp. Zool.** 295A: 200-205.

MACIEL, J.E.S. (2007). Efeito da composição da dieta sobre o metabolismo do lactato no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido a hipóxia e a recuperação da hipóxia. **Tese de Doutorado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

MAÑE-GARZON, F.; DEI-CAS, E.; HOLCMAN-SPECTOR, B; LEYMONIE, J. (1974). Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulación frente a cambios de salinidad. **Physis**, Buenos Aires. 33 (86) A: 163-171.

MARKS, D.B.; MARKS, A.D.; SMITH, C.M. (1996). Basic Medical Biochemistry. Baltimore: R.R. Donnelly e Sons, 806p.

MCLUSKY, D.D. (1989). The estuarine ecosystem. **Blackii Academic and Professional**, Glasgow: 215pp.

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

MIRANDA, R.B. (1994). Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a ionorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. **Dissertação de Mestrado**, FURG (Fundação Universidade Federal do Rio Grande), Rio Grande, RS, Brasil.

MOON, T.W. (1988). Adaptation, constraint and function of gluconeogenesis pathway. **Can. Journal Zool.** 66: 1059-1068.

NELSON, D.L.; COX, M.M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4 ed. EUA: editora W. H. Freeman, 2004.

ODUM, E.P. (1985). *Ecologia*. Interamericana (ed), Rio de Janeiro, 435p.

OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 188A: 1429-1435.

OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. (2000). Hepatopâncreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127B: 375-381.

OLSWANG, Y.; COHEN, H.; PAPO, O.; CASSUTO, H.; CRONIGER, C.M.; HAKIMI, P.; TILGHMAN, S.M.; HANSON, R.W.; RESHEF, L. (2002). A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. **PNAS**. 99 (2): 625-630.

PÉQUEUX, A. (1995). Osmotic regulation in Crustaceans. **J. Crust. Biol.** 15(1): 1-60.

RESHEF, L.; OLSWANG, Y.; CASSUTO, H.; BLUM, B.; CRONIGER, C.M.; KALHAN, S.C.; TILGHMAN, S.M.; HANSON, R.W. (2003). Glyceroneogenesis and the tryglyceride/fatty acid cycle. **J. Biol. Chem.** 278 (33): 30413-30416.

ROSA, R.; NUNES, M.L. (2002). Changes in organic índices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* e *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the Portuguese south coast. **Crustaceana**, Netherlands. 75 (9): 1095-1105.

SCHEIN, V. (1999). Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperos-



mótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

SCHEIN, V.; WACHÉ, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R.S.M. (2004). Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters**. 561: 202-206.

SCHEIN, V.; CHITTÓ, A.L.F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R.S.M. (2005a). Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 316: 203-212.

SCHEIN, V.; CHITTÓ, A.L.F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R.S.M. (2005b). Effect of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 140: 561-567.

SCHLISS, F.; HÄUSSINGER, D. (2002) The cell hydration state: a critical determinant for cell death and survival. **Biol. Chem**. 267: E343-E355.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (2002). Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente. 5ª ed.; Livraria Santos Editora.

SOMBERG, E.W.; MEHLMAN, M.A. (1969). The regulation of mitochondrial pyruvate metabolism in guinea-pig liver synthesizing precursors for gluconeogenesis. **Biochem. J**. 112: 435-447.

TURCATO, G.S. (1990). Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. **Monografia** (Bacharelado em Ciências Biológicas:

Zoologia), UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

VIANA, Y. A.; GARROTE FILHO, M. S.; PENHA-SILVA, N. (2005) Estabilização de proteínas por osmólitos. **Biosci. J.** 21 (2): 83-88.

VINAGRE, A.P.S.; DA SILVA, R.S.M. (1992). Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.** 102A: 579-583.

VINAGRE; A.P.S.; DA SILVA, R.S.M. (2002). Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Can. J. Zool.** 80: 1413-1421.

WACHÉ, Y. (2003). Rôle de la néoglucogénèse dans la régulation osmotique de l'hépatopancréas et des muscles du crabe estuarien *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Mémoire**. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Science de la Vie et de la Terre, France.

WIESE, J.T.; LAMBETH, D.O.; RAY, P.D. (1991). The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isoenzymes in various tissues of several mammals and birds. **Comp. Biochem. Physiol.** 100B (2): 297-302.

YANCEY, P.H.; CLARK, M.E.; HAND, H.C.; BOWLUS, R.D.; SOMERO, G.N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. **Science**. 217: 1214-1222.

ZAMMIT, V.A.; NEWSHOLME, E.A. (1978). Properties of piruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscle of the frog and marine invertebrates. **Biochem. J.** 174: 979-987.