

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas Da Saúde
Departamento de Fisiologia

**EFEITOS DA ADAPTAÇÃO PRÉVIA A DIETA RICA EM CARBOIDRATOS
OU RICA EM PROTEÍNAS SOBRE O PADRÃO DE RESPOSTA
METABÓLICA AO ESTRESSE HIPEROSMÓTICO DO CARANGUEJO
Chasmagnathus granulata Dana, 1851.**

VANESSA SCHEIN

Orientadora: **Dra. Roselis Silveira Martins da Silva**

Co-orientador: **Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski**

Dissertação de Mestrado submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio grande do Sul, para a obtenção do grau de mestre.

Porto Alegre, março de 1999

Aos meus pais, Ana e Nilton,
com amor

AGRADECIMENTOS

À doutora Roselis Silveira Martins da Silva, pelo exemplo de pesquisadora e pela dedicada orientação durante a minha formação científica.

Ao Doutor Luiz Carlos Rios Kucharski, meu especial reconhecimento, pela orientação, ensinamentos, paciência, amizade e bom humor

Às colegas Paula Eichler , Ana Lúcia Chittó e Márcia Trapp pela amizade, pelos agradáveis momentos de convivência e inestimável ajuda na execução dos experimentos e na elaboração dessa dissertação.

Ao Doutor Edison Capp, pela prontidão de auxílio nos momentos difíceis da elaboração desse trabalho

À técnica Maria Alice Machado, pela carinhosa amizade e manutenção do material necessários para a execução dos experimentos

Aos colegas de laboratório, pela ajuda e companhia agradável ao longo desse trabalho

Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, pela amizade

Aos professores e funcionários do departamento de Fisiologia da UFRGS, pela convivência, ensinamentos e amizade.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado

À FAPERGS e à FINEP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO.....	14
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1. COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	29
2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i>	29
2a. Determinação da concentração de glicose na hemolinfa.....	29
2b. Determinação da concentração de aminoácidos na hemolinfa.....	29
2c. Isolamento e determinação do glicogênio	29
2d. Determinação da concentração da glicose livre	29
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS <i>IN VITRO</i>	29
3a. Captação de glicose	29
3b. Síntese de proteínas.....	29
4. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	29
RESULTADOS.....	29
1. EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRESSE HIPEROSMÓTICO SOBRE O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO CARANGUEJO <i>CHASMAGNATHUS GRANULATA</i> ALIMENTADO COM UMA DIETA RICA (RC) EM CARBOIDRATOS OU PROTEÍNAS (RP) ..	29
1.2 Concentração de glicose livre e de glicogênio no hepatopâncreas ao longo do estresse hiperosmótico.....	29
1.3. Efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de glicose no hepatopâncreas	29
1.4 Concentração de glicose livre e de glicogênio no músculo ao longo do estresse hiperosmótico.....	29

1.5 Efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de glicose no músculo.....	29
1.6 Concentração de glicose livre e de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores ao longo do estresse hiperosmótico.....	29
1.7 Efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de glicose nas brânquias anteriores e posteriores.....	29
2. EFEITO DE DIFERENTES PERÍODOS DE ESTRESSE HIPEROSMÓTICO SOBRE O METABOLISMO DE COMPOSTOS NITROGENADOS NO CARANGUEJO <i>CHASMAGNATHUS GRANULATA</i> ALIMENTADO COM UMA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS OU PROTEÍNAS	29
2.1. Concentração de aminoácidos na hemolinfa ao longo do choque hiperosmótico	29
2.2. Estudo <i>in vitro</i> da síntese de ¹⁴ C-proteínas no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos adaptados à dieta RC ou RP e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico	29
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos do estresse hiperosmótico sobre o metabolismo de carboidratos, as concentrações hemolinfáticas de aminoácidos livres e a síntese de proteínas no caranguejo *C. granulata* previamente adaptado a uma dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP).

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: um grupo alimentado com a dieta RC e outro com a dieta RP, durante um período de aclimação de três semanas. Após esse período, os animais foram submetidos ao estresse hiperosmótico por 24, 72 e 144 horas, período em que mantiveram seu comportamento alimentar normal.

Nos animais submetidos à 24, 72 e 144 horas de estresse hiperosmótico, foram analisadas as concentrações de glicose hemolinfática, os níveis de glicose livre e de glicogênio no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores. As concentrações de aminoácidos livres hemolinfáticos, a captação de glicose e a síntese de proteínas, no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores, foram determinadas nos grupos submetidos à 24 e 72 horas de estresse hiperosmótico.

No grupo de animais adaptados à dieta RC, o estresse hiperosmótico aumentou em 40% ($p < 0,05$) a concentração hemolinfática de glicose às 144

horas. No grupo de animais submetidos à dieta RP não foram verificadas alterações da glicemia ao longo dos períodos de estresse estudados.

As concentrações de glicogênio no tecido hepatopancreático do grupo de animais adaptados à dieta rica em carboidratos não foram alteradas significativamente ao longo do estresse hiperosmótico. Contudo, tanto os níveis de glicose livre como a captação de glicose aumentaram após 72 horas de choque hiperosmótico. Nos animais adaptados à dieta RP a concentração de glicogênio hepatopancreático diminuiu 60% ($p > 0,05$) às 24 horas de choque hiperosmótico, entretanto, os níveis de glicose livre aumentaram em 40% às 72 horas. Nesse grupo, o estresse hiperosmótico de 72 horas não alterou a capacidade de captação de glicose pelo tecido hepatopancreático.

No tecido muscular do grupo de animais alimentados com a dieta RP, não foram verificadas alterações significativas das concentrações de glicose livre, de glicogênio e na captação de glicose. Entretanto, no grupo RC, o estresse hiperosmótico de 24 horas determinou um aumento de 3,7 vezes ($p < 0,05$) da concentração de glicogênio, e de 30% ($p > 0,05$) dos níveis de glicose livre às 72 e 144 horas de choque hiperosmótico. A captação de glicose no tecido muscular do grupo RC, não foi alterada com o estresse hiperosmótico de 72 horas.

As concentrações de glicose livre e de glicogênio, nas brânquias anteriores e posteriores dos animais alimentados com a dieta RC, não foram afetadas significativamente pelo estresse hiperosmótico. Nas brânquias anteriores e posteriores do grupo RP, ocorreu um aumento de

aproximadamente 50% ($p < 0,05$) dos níveis de glicose livre às 24 horas, e de cerca de 60% ($p < 0,05$) das concentrações de glicogênio às 72 horas. Em ambos os grupos experimentais, 72 horas de estresse hiperosmótico não determinaram alterações significativas na capacidade de captação de glicose nas brânquias anteriores e posteriores.

As concentrações micromolares dos aminoácidos glicina, serina, arginina, alanina e prolina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos RC e RP controles. Nos animais adaptados à dieta RC, as concentrações de glicina diminuíram marcadamente ($p < 0,05$) às 24 horas (62%) e às 72 horas (52%) de estresse hiperosmótico; a serina diminuiu em cerca de 40% ($p > 0,05$) às 72 horas; a arginina diminuiu nas primeiras 24 horas de choque hiperosmótico em aproximadamente 70% ($p > 0,05$). A alanina e a prolina hemolinfáticas mantiveram seus níveis constantes ao longo do choque hiperosmótico.

Nos animais do grupo RP, o estresse hiperosmótico reduziu os níveis hemolinfáticos da glicina em cerca de 30% e 40% ($p > 0,05$) às 24 e 72 horas, respectivamente; as concentrações hemolinfáticas de arginina, de alanina e de prolina aumentaram ($p > 0,05$) durante os períodos de choque hiperosmótico estudados. A concentração hemolinfática de serina manteve-se constante.

O choque hiperosmótico de 72 horas foi efetivo em determinar um aumento da capacidade de síntese de proteínas nos animais do grupo RP. Nos tecidos hepatopancreático e muscular o aumento da síntese de

proteínas foi de aproximadamente 45%; nas brânquias posteriores esse aumento foi de 61%. Nos caranguejos adaptados à dieta RC, somente o tecido hepatopancreático teve a sua capacidade de síntese de proteínas aumentada em cerca de 45%.

Os resultados sugerem que o padrão de ajuste metabólico, durante o estresse hiperosmótico, nos caranguejos previamente alimentados com a dieta RP difere daquele observado nos animais mantidos previamente com a dieta RC.

ABSTRACT

The present work had the objective to determine the effects of hiperosmotic stress on the carbohydrate metabolism, the free haemolymphatic amino acid concentration and the synthesis of proteins in the crab *Chasmagnathus granulata* previously adapted to either a diet rich in carbohydrate (RC) or rich in proteins (RP).

The animals were divided into two experimental groups: one fed with RC diet and other with RP diet , during an acclimatization period of three weeks. After this period, the animals were submitted to hiperosmotic stress for 24, 72 and 144 hours, maintaining their normal feeding behavior.

In the animals submitted to 24, 72 and 144 hours of hiperosmotic stress, haemolymphatic glucose concentrations, levels of free glucose and glycogen in hepatopancreas, muscle and anterior and posterior gills were analyzed. Free haemolymphatic amino acid concentration, glucose uptake and protein synthesis in hepatopancreas, muscle and anterior and posterior gills were determined in the groups submitted to 24 and 72 hours of hiperosmotic stress.

In the group of animals adapted to RC diet, hiperosmotic stress increased in 40% ($p < 0.05$) the haemolymphatic concentration of glucose in

144 hours. In the group of animals submitted to the RP diet, there were no alterations verified in glicemia during the studied periods of stress.

Glycogen concentrations in the hepatopancreatic tissue in the group of animals adapted to the diet rich in carbohydrates were not altered along the hiperosmotic stress. Nevertheless, both free glucose levels and glucose uptake increased at 72 hours of hiperosmotic shock. In the animals adapted to RP diet, the hepatopancreatic glycogen concentration decreased 60% ($p < 0.05$) at 24 hours of hiperosmotic shock, although free glucose levels increased in 40% at 72 hours. In this group, the 72 hours hours of hiperosmotic stress did not alter the glucose uptake capacity by the hepatopancreatic tissue.

In the muscular tissue of the animals fed with RP diet, significant alterations on free glucose, glycogen and glucose uptake were not verified. Nevertheless, in RC group, the 24-hour hiperosmotic stress determined an increase of 3.7-fold ($p < 0.05$) in glycogen concentration and of 30% ($p < 0.05$) in free glucose levels at 72 and 144 hours of hiperosmotic shock. Glucose uptake in the RC group muscular tissue was not altered by 72-hour hiperosmotic stress.

Free glucose and glycogen concentrations in anterior and posterior gills of the animals fed with the RC diet were not significantly affected by the hiperosmotic stress. In the anterior and posterior gills of the RP group, there was an increase of approximately 50% ($p < 0.05$) in the free glucose levels at 24 hours, and around 60% ($p < 0.05$) of glycogen concentrations at 72 hours.

In both experimental groups, 72-hours of hiperosmotic stress did not determine significant alterations in the glucose uptake capacity in the anterior and posterior gills.

Micromolar concentrations of amino acids glicine, serine, arginine, alanine and proline did not show significant differences among control groups RC and RP. In the animals adapted to the RC diet, the concentrations of glicine decreased remarkably ($p < 0.05$) at 24 hours (62%), and 72 hours (52%) of hiperosmotic stress; serine decreased about 40% ($p < 0.05$) at 72 hours; arginine decreased approximately 70% ($p < 0.05$) by the first 24 hours of hiperosmotic shock. Haemolympathic alanine and proline were kept in their constant levels during the hiperosmotic shock.

In the animals of RP group, the hiperosmotic stress decreased the haemolympathic levels of glicine about 30% and 40% ($p < 0.05$) at 24 and 72 hours respectively; the haemolympathic concentrations of arginine, alanine and proline increased ($p < 0.05$) during the studied periods of hiperosmotic shock. Haemolympathic concentration of serine was maintained constant.

The hiperosmotic shock of 72 hours was effective in determining an increase in the protein synthesis capacity in the group RP animals. The increase of protein synthesis in hepatopancreatic and muscular tissue was approximately 45%; in posterior gills, this increase was of 61%. In the crabs adapted to a RC diet, only hepatopancreatic tissue had its protein synthesis increased around 45%.

The results suggest that the pattern of metabolic adjustments during hiperosmotic stress in crabs previously fed with a diet rich in proteins is different from that observed in the animals previously maintained with a RC diet.

INTRODUÇÃO

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinho e límnicos, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros de completa exposição do substrato. Esses ecossistemas, que constantemente sofrem a influência de fatores oceanográficos e meteorológicos, impõem a sua biota um elevado estresse ambiental. O estresse pode ser gerado tanto pelas variações extremas de fatores como a salinidade, a temperatura, bem como pela quantidade de O₂ dissolvido no habitat e pelos ciclos das marés (Cooper, 1974; Odum, 1985).

As variações extremas dos fatores ambientais, em estuários e marismas, exercem um controle seletivo e severo sobre as espécies que habitam essas áreas. Mudanças tanto comportamentais como estruturais e funcionais (Kinne, 1964 apud Miranda, 1994) ocorrem nos organismos lagunares e estuarinos, capacitando-os à tolerar as alterações freqüentes das características físico-químicas do meio.

A Lagoa de Tramandaí, que faz parte do Sistema Lagunar de Tramandaí, está localizada no litoral norte da Planície Costeira do Rio Grande do Sul (latitude 29° 58'S e longitude 50° 08'O). Nesse Sistema Lagunar de Tramandaí estão incluídas as Lagoas Armazém e Tramandaí, que corresponde a uma zona designada como Estuário de Tramandaí (Alvarez, 1979; Lira et al., 1976; Würdig, 1984, Turcato, 1990).

A Lagoa de Tramandaí comunica-se com o Atlântico por um curto canal de cerca de 1,5 km, o qual foi regularizado artificialmente pela fixação da Barra de Tramandaí. Em relação às características físicas das margens da Lagoa de Tramandaí, destacam-se as presenças de praias arenosas, de praias areno-sílticas, feixes de restinga e áreas palustres.

Em marismas à margem leste da Lagoa de Tramandaí, Turcato (1990) verificou que o teor de O₂ dissolvido na água varia entre 2,78 a 11,78 mgO₂/L e a salinidade oscila de 0,22 a 35‰. Nesse ambiente, populações de *Chasmagnathus granulata*, um caranguejo da família Grapsidae (Decapoda, Crustacea) são encontradas em abundância.

O caranguejo *C. granulata*, que evoluiu a partir de formas marinhas, é uma espécie tipicamente estuarina. Ele habita pântanos salgados ou marisma de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o Golfo de São Martin, na Argentina (Rathbum, 1918; Boschi, 1964).

Em seu habitat, o *C. granulata* distribui-se, preferencialmente, entre os pisos supra e mesolitorâneos, em áreas inundáveis, com ou sem vegetação halo-hidrófila. Nestes locais, a espécie abre galerias ou tocas com profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático, fazendo com que sempre haja água no fundo da toca. Essas habitações têm papel importante na ecofisiologia do *C. granulata*, na medida em que minimizam as amplitudes de variações de salinidade e de temperatura.

Diariamente, os caranguejos deslocam-se até o mesolitoral inferior, podendo atingir o infralitoral nos meses da primavera e verão (Turcato, 1990), locais onde buscam alimento. A espécie pode permanecer longos períodos fora da água, sendo considerada por Mañe-Garzon et al. (1974), como tipicamente semi-terrestre. Entretanto, o sistema respiratório desses animais está pouco adaptado à respiração aérea (Santos et al., 1987).

Em relação ao hábito alimentar, *C. granulata* foi classificado como oportunista, sendo que a análise do conteúdo estomacal demonstrou a presença de sedimentos, de restos vegetais e de itens de origem animal (D'Incao et al., 1990). *C. granulata* também pode comportar-se como omívoro-detritivo, alimentando-se de peixes e mamíferos aquáticos. Eventualmente, comporta-se como canibalista, atacando suas próprias comunidades (Botto-Irigoyen, 1980 apud Turcato, 1990).

O caranguejo *C. granulata*, dada a excelente adaptação às condições de laboratório, é considerado um modelo biológico muito adequado para a investigação sobre o controle do metabolismo intermediário em invertebrados (Kucharski, 1990).

O estudo do metabolismo intermediário em crustáceos tem mostrado grande variabilidade inter e intra-espécies, devido às peculiaridades biológicas e ecológicas, o que torna difícil a generalização. Tais peculiaridades podem ser atribuídas a múltiplos fatores, tais como o habitat (terrestre, marinho, estuarino ou de água doce), estágio do ciclo da muda, maturidade sexual, estado alimentar e dieta oferecida.

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

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

Os tecidos que apresentam a maior reserva de glicogênio em crustáceos são o músculo, o hepatopâncreas, o coração, a hemolinfa e as brânquias (Johnston e Davies, 1972; Herreid e Full, 1988, Loret et al. 1989; Vinagre e Da Silva, 1992 e Kucharski Da Silva, 1991a; b). O glicogênio armazenado é utilizado como fonte de energia, como por exemplo, na muda, em resposta ao estresse, no ciclo reprodutivo e durante períodos de jejum (Chang e O'Connor, 1983; Kucharski e Da Silva 1991a e b , Vinagre e Da Silva, 1992).

Kucharski e Da Silva (1991 a; b), trabalhando com *C. granulata*, verificaram que o padrão do metabolismo energético apresenta mudanças

marcantes em função do conteúdo de carboidratos ou proteínas contidos na dieta administrada. Nos animais alimentados com a dieta rica em carboidratos a concentração de glicose na hemolinfa e o conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo aumentam significativamente em relação aqueles do grupo mantido com a dieta proteica. Estes autores, ao investigarem o efeito da variação sazonal sobre o metabolismo energético desse crustáceo, verificaram que o glicogênio estocado pelo hepatopâncreas e pelo músculo seria consumido como substrato energético durante os meses de primavera e verão. Já no outono e no inverno, os lípidios musculares seriam o substrato energético preferencial.

O estudo do efeito do jejum sobre o metabolismo de carboidratos e proteínas, no caranguejo *C. granulata* previamente alimentado com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas, demonstrou que a composição da dieta administrada preliminarmente aos caranguejos determina um padrão diferencial de resposta metabólica ao jejum (Vinagre e Da Silva, 1992). Nos animais alimentados com a dieta rica em proteínas, os níveis de glicose na hemolinfa foram mantidos pela gliconeogênese a partir de aminoácidos e de carbonos derivados da mobilização de polissacarídeos musculares (Oliveira, 1993). Entretanto, nos animais que foram adaptados a uma dieta rica em carboidratos, o glicogênio do hepatopâncreas foi a principal fonte energética durante o período de restrição alimentar (Vinagre e Da Silva, 1992). Em relação às proteínas totais, Vinagre (1992) constatou, no hepatopâncreas e no tecido muscular, que a concentração de proteínas aumenta ao longo do

jejum. Porém, um perfil diferencial foi verificado no tecido branquial, pois o jejum de quatro semanas levou à redução dos níveis de proteínas.

Ao contrário do que ocorre em vertebrados, em *C. granulata* a capacidade intrínseca do tecido hepatopancreático de sintetizar glicose a partir de alanina ou ácido láctico, é similar entre os grupos de animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas (Oliveira e Da Silva, 1997).

Da Silva e Kucharski (1992), estudando o efeito do estresse hiposmótico sobre as reservas de carboidratos no hepatopâncreas e no músculo de *C. granulata*, demonstraram em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos e submetidos a diferentes tempos de estresse hiposmótico, uma diminuição significativa dos níveis de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo. Nesse mesmo estudo, os autores demonstraram que a dieta rica em proteínas combinada ao estresse hiposmótico de 72 horas, leva ao aumento de glicogênio no hepatopâncreas, porém, não altera as reservas deste polissacarídeo no músculo. Utilizando o mesmo protocolo experimental, Oliveira e Da Silva (1999) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica no hepatopâncreas de *C. granulata* durante a adaptação ao estresse hiposmótico. Ambos trabalhos evidenciaram o efeito da composição da dieta sobre a capacidade adaptativa desses caranguejos ao estresse hiposmótico, onde os animais que foram tratados com a dieta rica em proteínas tiveram 100% de sucesso no processo de regulação osmótica e os animais alimentados com a dieta rica em

carboidratos apresentam uma taxa de 20% de sobrevivência ao estresse hiposmótico.

Santos e Nery (1987), estudando o efeito do estresse osmótico sobre os níveis de glicose hemolinfática de *C. granulata*, constataram que os animais aclimatados a 30‰ e expostos à salinidade de 10 ou 20‰ não mostraram diferenças significativas na glicemia. Entretanto, nos animais aclimatados a 30‰ e submetidos a salinidade de 0‰ por 72 horas, a glicose na hemolinfa atinge valores nulos, sendo restabelecidos após 168 horas de choque hiposmótico. Também, valores nulos de glicemia foram constatados naqueles animais aclimatados a 30‰ e submetidos à salinidade de 40‰. Os autores sugerem que o caranguejo *C. granulata* estaria melhor adaptado ao estresse hiposmótico do que ao estresse hiperosmótico.

Outro fator que vem sendo estudado em crustáceos é o controle hormonal sobre o metabolismo intermediário. Em invertebrados, os fatores hormonais capazes de controlar o metabolismo de carboidratos, de proteínas e de lipídios são pouco conhecidos. Diversos trabalhos têm sugerido que a síntese/degradação de glicogênio em invertebrados estariam controladas por fatores hormonais. Sanders (1983a, b, c), trabalhando com a lagosta *Homarus americanus*, constatou a presença de uma proteína semelhante à insulina na glândula digestiva e na hemolinfa desse crustáceo. A autora verificou que a insulina de mamífero foi capaz de aumentar a incorporação de ¹⁴C-glicose em glicogênio no tecido muscular dessa espécie. Kucharski et al. (1997) demonstraram a presença de sítios de ligação à insulina no tecido branquial do caranguejo *C. granulata* com características similares às aquelas

de mamíferos. Recentemente, foi demonstrado que o receptor de insulina nas brânquias do caranguejo *C. granulata* possui atividade tirosina quinase da mesma forma que o receptor de mamíferos (Kucharski et al., 1999). Também, foi comprovado que diferentes doses de insulina de mamífero estimulam a captação de 2-Deoxi-D-glicose-¹⁴C e a síntese de glicogênio a partir de glicose-U-¹⁴C no tecido branquial desse caranguejo (Kucharski, 1997). No camarão *Penaeus monodon*, Lin et al. (1993) identificaram e purificaram receptores para insulina no tecido hepatopancreático. Também no camarão *Penaeus japonicus*, Chuang e Wang (1994) demonstraram que os receptores de insulina do tecido muscular apresentavam propriedades similares àquelas observadas em tecidos clássicos de mamíferos.

O hormônio hiperglicemiante (CHH) é outro hormônio que está envolvido com a regulação do metabolismo de carboidratos em crustáceos. O CHH é um dos neurohormônios mais estudado em crustáceos. É produzido e secretado pelo complexo órgão X-glândula do seio, de onde é secretado para a hemolinfa. Este hormônio já foi isolado e sua estrutura primária determinada em muitos crustáceos (Kegel et al., 1989; Keller, 1992; Santos e Keller, 1993a; b). Os estudos realizados com o CHH têm demonstrado que a sua função principal é o controle da homeostase da glicose em crustáceos. Foram identificados receptores para esse hormônio no hepatopâncreas, no coração, na epiderme e no órgão Y do caranguejo *Carcinus maenas* (Kummer e Keller, 1993; Webster, 1993). Entretanto, o tecido hepatopancreático parece ser o órgão alvo do CHH, o qual teria seus níveis de glicogênio reduzido quando sob a ação desse hormônio (Seldmeir,

1987; Santos e Keller, 1993 a, b; Morris e Airriess, 1998). Segundo Santos e Keller (1993b), os níveis de glicose hemolinfática atuam, por retroalimentação negativa, sobre o complexo órgão X-glândula do seio, alterando assim a secreção de CHH. Alguns estudos têm demonstrado alterações nos níveis hemolinfáticos de glicose e CHH em crustáceos submetidos à anaerobiose, ao jejum, ao estresse osmótico e a elevações da temperatura (Keller e Orth, 1990; Santos e Keller, 1993a, b; Vinagre, 1998; Morris e Airriess, 1998).

As respostas funcionais às alterações ambientais compreendem respostas que conduzem ao estado de equilíbrio. Estão incluídas nessas respostas, alterações fisiológicas, padrões de respostas ontogênicas, compensações morfológicas e a seleção de tipos geneticamente adaptados. O tempo e o padrão das respostas variam de acordo com o organismo, a duração e a magnitude das alterações ambientais (Prosser, 1958).

Oliveira (1998), estudando os efeitos da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no caranguejo *C. granulata*, constatou que após 4 horas de anoxia ambiental, os animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos apresentavam uma marcante hiperglicemia e níveis reduzidos de glicose livre e de glicogênio no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias. Segundo a autora, os resultados sugerem que a diminuição dos níveis de oxigênio ambiental levaria a ativação da via glicolítica (glicólise anaeróbia), proporcionando, assim, a manutenção ou aumento da produção de ATP, visto que as vias de produção dependentes de O₂ estariam significativamente reduzidas.

Está bem documentado na literatura que em áreas estuarinas e intertidais, as flutuações constantes da salinidade impõem um estresse iônico e ambiental à sua biota. Essas variações de salinidade levam os organismos estuarinos e marinhos intertidais à mudanças na composição orgânica e inorgânica dos fluidos corporais, exigindo desses animais ajustes homeostáticos compensatórios (Kasschau et al., 1984; Matsushima e Yamada, 1992; Bishop e Burton, 1993; Okuma e Abe, 1994; Robinson 1994; Pillet et al., 1995).

A capacidade osmorreguladora, com certeza, desempenhou um importante papel na evolução e na conquista do habitat estuarino pelos organismos. Nos crustáceos eurialinos, a osmolaridade do fluido extracelular pode variar de maneira diversa em função da osmolaridade do meio ambiente. Entre os crustáceos decápodes, encontram-se desde animais marinhos estenoalinos com pouca ou nenhuma capacidade osmorreguladora, portanto, tolerantes a pequenas variações de salinidade, até animais estuarinos eurialinos capazes de tolerar grandes variações na salinidade do meio e com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa (Huggins e Munday, 1968; Mantel e Farmer, 1983).

Considerando-se as variações na concentração dos fluidos corporais dos organismos aquáticos em resposta as variações ambientais, distinguem-se duas formas de ajustes fisiológicos: osmoconformação e osmorregulação (Gilles, 1983; Spaargaren, 1995). A regulação isosmótica do líquido intracelular implica em duas fases de controle do volume celular. A primeira fase é relativa às respostas imediatas de alteração do volume celular, como

consequência de choques osmóticos, e envolve a plasticidade da membrana plasmática. A segunda fase do reajuste do volume celular está relacionada com eventos de influxo e efluxo de efetores osmóticos, tanto orgânicos (aminoácidos livres) como inorgânicos (Na^+ , Cl^- e K^+) (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997). Entre os efetores inorgânicos, o íon K^+ é essencialmente importante durante os choques hipo-hiperosmótico, pois proporciona uma limitação imediata da alteração excessiva do volume celular em invertebrados eurialinos (Gilles, 1987, Miranda, 1994; Gilles, 1997). Contudo, os efetores orgânicos são indicados como os principais responsáveis pelo reajuste do volume celular durante alterações osmóticas do meio extracelular (Gilles e Delpire, 1997; Gilles, 1997).

Diversos estudos em diferentes espécies de crustáceos decápodes sugerem um controle neuroendócrino sobre o mecanismo osmorregulatório (Mantel, 1985; Muramoto, 1988; McNamara et al., 1990; Kamemoto, 1991; Eckhardt et al., 1995). Os trabalhos realizados tanto *in vitro* em brânquias isoladas como *in vivo* indicam o envolvimento do pedúnculo ocular no processo de regulação osmótica em crustáceos. Em *Pachygrapsus marmoratus*, Eckhardt et al. (1995), demonstraram a presença de um peptídeo de mais de 500 Da liberado pela glândula do seio que estaria envolvido no controle da osmorregulação nesse crustáceo.

Postula-se que as respostas fisiológicas do metabolismo dos compostos nitrogenados, atuam através de modificações na síntese e degradação de aminoácidos livres, no transporte desses aminoácidos pelas membranas plasmáticas e pelo “turnover” de proteínas, que serviriam como

reserva desses aminoácidos (Schoffeniels, 1976; Gilles, 1982; Gilles, 1997). A partir de vários estudos realizados em invertebrados, Gilles (1982) propôs a ocorrência, durante o ajuste homeostático, de mudanças na concentração dos aminoácidos livres tissulares, os quais seriam utilizados em três mecanismos básicos: (1) deslocamento do equilíbrio entre influxo e efluxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; (2) alterações nas taxas de síntese e oxidação desses aminoácidos livres tissulares; (3) modificação entre a síntese e a utilização de proteínas.

A literatura descreve que o estresse osmótico em crustáceos ou outros invertebrados marinhos, leva a uma alteração na concentração dos aminoácidos livres intracelulares. Concentrações de aminoácidos não-essenciais, como por exemplo, a glicina, a prolina e a alanina, após mudanças ambientais de salinidade, podem variar de 0,1 a 0,2 M em crustáceos marinhos. Assim, os aminoácidos livres aliados a compostos nitrogenados como a oxidotrimetilamina e a betaína, perfazem 50 a 60 % dos efetores osmóticos nessa superclasse.

Em crustáceos, a concentração de aminoácidos livres tissulares é cerca de 10 vezes maior que aquela dos tecidos de mamíferos, enquanto que os níveis plasmáticos são equivalentes (Huggins e Munday, 1968; Gilles, 1997). Está descrito na literatura que a arginina, a alanina, a glicina, a prolina, o ácido glutâmico e a taurina são os mais importantes efetores osmóticos orgânicos. Entretanto, a contribuição relativa de cada aminoácido aos ajustes osmóticos pode variar marcadamente entre as espécies e entre os diversos tecidos de uma mesma espécie (Huggins e Munday, 1968; Bowlus e

Somero, 1979; Chang e O'Connor, 1983; Mantel e Farmer, 1983; Bishop e Burton, 1993).

O caranguejo de água doce *Eriocheir sinensis*, tem parte de seu ciclo reprodutivo desenvolvido no mar. Nessa espécie, estudos sobre o efeito de estresse hiperosmótico demonstraram que os níveis de aminoácidos livres tissulares aumentavam cerca de duas vezes quando comparados àqueles dos animais aclimatados à água doce. Esta resposta foi atribuída, principalmente, a um grande aumento nas concentrações de aminoácidos não-essenciais, tais como, a arginina, o ácido glutâmico, a glicina e a prolina (Bricteux-Gregoire et al., 1962). Estudos similares realizados com o caranguejo *C. maenas* mostraram que os níveis intracelulares de alanina, ácido glutâmico, glicina e prolina foram consideravelmente maiores em animais adaptados ao estresse hiperosmótico do que naqueles mantidos em água salobra (Duchateau et al., 1959). Siebers (1974) e Gilles (1977) propõem que o aumento dos aminoácidos livres no tecido muscular seria atribuído à hidrólise de proteínas hemolinfáticas, de onde os aminoácidos seriam transportados, com o objetivo aumentar a pressão osmótica intracelular.

Em relação ao estudo do metabolismo de proteínas, poucos trabalhos têm sido realizados em crustáceos. Koenig (1981), através de experimentos com os radioisótopos ^3H -glicina e ^3H -prolina, demonstrou que a degradação de proteínas tissulares serviria como uma fonte de aminoácidos livres no camarão *Penaeus setiferus* juvenil, submetido ao estresse hiperosmótico agudo. O autor observou que houve uma significativa redução das proteínas no tecido hepatopancreático em resposta ao estresse, que serviriam como

fonte de aminoácidos para os reajustes osmóticos necessários à manutenção da homeostase celular.

Em relação ao tecido branquial, são escassas as informações em crustáceos sobre o envolvimento do metabolismo intermediário durante o processo de osmorregulação. Supõe-se que o transporte de íons seja o processo que mais consome energia nesse tecido, entretanto, o estado nutricional do animal, a temperatura e o estágio de desenvolvimento são fatores cruciais na determinação do “turnover” das proteínas branquiais, e geralmente a síntese está reduzida no animal em regime de restrição alimentar (Lyndon e Houlihan, 1998). Houlihan et al. (1990), estudando a síntese de proteínas nas brânquias do caranguejo *C. maenas*, verificaram que três horas após uma refeição, a síntese de proteínas era 100% mais elevada quando comparada àquela dos animais que foram alimentados em dias alternados ou que permaneceram em jejum por sete dias.

Em crustáceos intertidais eurialinos, o sucesso dos processos de osmorregulação levam à ajustes tanto estruturais como funcionais que permitem a esses animais a colonização do ambiente estuarino. Entretanto, essas adaptações requerem diferentes fontes energéticas, embora pouco se saiba à respeito das alterações do padrão e no custo metabólico durante os processos de osmorregulação em crustáceos.

OBJETIVOS

Ao longo dos últimos anos poucos trabalhos investigaram o papel do estresse osmótico sobre o metabolismo de carboidratos e proteínas em crustáceos (Tan e Choong , 1981; Nery e Santos, 1987, Houlihan et al., 1990; Da Silva e Kucharski,1992; Vinagre, 1992; Oliveira, 1993; Oliveira e Da Silva, 1999).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos do estresse hiperosmótico sobre o metabolismo de carboidratos e compostos nitrogenados em caranguejos *C. granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP).

Para isto, foram objetivos específicos:

1. Avaliar, *in vivo*, os efeitos de diferentes períodos de estresse hiperosmótico sobre os níveis de glicose na hemolinfa, e sobre as concentrações de glicose livre e glicogênio nos tecidos hepatopancreático, muscular e branquial em animais alimentados com uma dieta RC ou RP;

2. Avaliar, *in vitro*, os efeitos do estresse hiperosmótico de 72 horas e da dieta RC ou RP sobre a captação de glicose pelo hepatopâncreas, músculo e brânquias anteriores e posteriores;

3. Avaliar, *in vitro*, os efeitos da dieta RC ou RP e do estresse hiperosmótico de 72 horas sobre a síntese de proteínas no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores.

4. Determinar as concentrações de aminoácidos hemolinfáticos de animais alimentados com as dietas RC ou RP e o efeito do estresse hiperosmótico de 24 e 72 horas sobre essas concentrações.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e manutenção dos animais

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (CRUSTACEA-DECAPODA- Grapsidae) é encontrado em comunidades abundantes às margens dos marismas da costa brasileira, a partir do litoral do Rio de Janeiro até a costa argentina no litoral patagônico (Boschi, 1964). Os animais utilizados no presente estudo foram coletados na margem leste da Lagoa de Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil (coordenadas 29°58' longitude Oeste), em um marisma tipicamente estuarino, parcialmente coberto por vegetação halo-hidrófila e cortado por arroios que drenam a água de origem pluvial da planície costeira. O clima da região é considerado subtropical úmido, com temperatura média anual de 17,6 °C e precipitação pluviométrica inferior a 1300 mm anuais (Moreno, 1961).

As coletas foram realizadas durante a primavera, o verão e o outono dos anos de 1996 a 1998, com permissão das autoridades do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, licença 138/91-Devies). Os animais foram capturados manualmente no sedimento areno-lodoso, dentro da água ou nas tocas e transportados até o laboratório em caixas plásticas com água do próprio local. Para minimizar possíveis efeitos fisiológicos do ciclo reprodutivo e de períodos de

intermudas, foram utilizados somente caranguejos machos adultos no período C do ciclo de intermudas (Drach e Tchernigovtzeff, 1967).

No laboratório os animais foram submetidos a um choque hiposmótico (água destilada) por 24 horas, a fim de limpar o conteúdo estomacal e eliminar parasitas. A seguir, os animais foram divididos em dois grupos experimentais conforme a dieta administrada: rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP). Durante as três semanas seguintes de adaptação às dietas, os animais foram mantidos em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo natural e oxigenação constante. Os animais eram alimentados *ad libitum* todos os dias ao final da tarde (período de maior atividade destes animais no seu habitat natural). As dietas RC e RP consistiam, respectivamente, de arroz branco cozido e carne bovina crua. A composição das dietas RC e RP foi determinada pelo Dr. Crystoph Bernasiuk (ICTA/UFRGS-), sendo que ambas as dietas apresentam equivalência calórica (Tabela 1).

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

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

2. Procedimentos experimentais *in vivo*

Após as três semanas de adaptação à dieta RC ou RP, os animais foram submetidos ao estresse hiperosmótico por 24, 72 e 144 horas.

Para a realização do estresse hiperosmótico foi utilizada água marinha artificial preparada no laboratório com sal marinho (marca CORAL LIFE). A salinidade utilizada para a realização dos experimentos foi de 35 ‰, determinada com refratômetro (marca ATAGO S/MILL). A salinidade de 35‰ foi escolhida por ser a mais alta salinidade encontrada no local de coleta dos animais (Turcato, 1990).

Durante o período de estresse hiperosmótico os animais foram mantidos em aquários com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, oxigenação e alimentação do período de aclimatação às dietas, recebendo alimento até 16 horas antes de serem sacrificados. A taxa de mortalidade, ao longo do estresse hipersalino, foi nula.

Ao final dos períodos experimentais de 24, 72 e 144 horas de choque hiperosmótico, os animais foram imediatamente crioanestesiados e amostras de hemolinfa foram coletadas para a determinação dos níveis de glicose. Nos grupos submetidos a 24 e 72 horas de estresse, amostras de hemolinfa foram coletadas para a determinação da concentração de aminoácidos livres.

A hemolinfa foi coletada das articulações do 4º e 5º pereiópodos, utilizando-se seringas de insulina e anticoagulante oxalato de potássio a 10%. A seguir, a carapaça dos animais era removida e amostras de hepatopâncreas, de músculo e de brânquias anteriores e posteriores foram retiradas para a determinação das concentrações de glicogênio e glicose livre. As brânquias foram divididas em anteriores e posteriores por exercerem funções distintas, estando as brânquias anteriores mais envolvidas com o processo respiratório e as posteriores com os processos fisiológicos da osmorregulação (Welcomme e Devos, 1994).

Como grupo controle foram utilizados os animais alimentados com as dietas RC e RP e mantidos nos aquários com salinidade de 20‰. Os

controles foram sacrificados juntamente com os animais dos grupos de estresse hiperosmótico, para a realização das dosagens bioquímicas.

2a. Determinação da concentração de glicose na hemolinfa

Os níveis de glicose na hemolinfa foram determinados pelo método enzimático da glicose-oxidase com o kit Glicose Enz-Color (marca BIO DIAGNÓSTICA INDÚSTRIA CLÍNICA LTDA.). Os resultados foram expressos em mg/dl.

2b. Determinação da concentração de aminoácidos na hemolinfa

A extração dos aminoácidos na hemolinfa foi realizado conforme método descrito por Pierce (1971) com algumas adaptações: a hemolinfa coletada foi colocada em tubos eppendorf (previamente lavados com HCl 0,6N), contendo etanol 80% (hemolinfa:etanol v/v). Esta mistura foi agitada e colocada em banho-maria a 75°C por 30 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 20.000xg por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado, e esta fase líquida foi evaporada em um dispositivo de secagem de amostra (marca UNIEQUIP, modelo Univapo 150H). A determinação dos aminoácidos no resíduo resultante foi realizada pelo Dr. Eduardo Brandt de Oliveira (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP) segundo método de Barbarash e Quarles (1982), onde o resíduo resultante foi ressuspendido em tampão sódio (pH 2,2) e a determinação dos aminoácidos foi executada em um analisador automático (marca Beckman, modelo 120), equipado com

uma coluna simples (6 x 220 mm, Beckman W-3) e um sistema de reagentes de ninhidrina para detecção colorimétrica de aminoácidos. As condições usadas para a realização da cromatografia foram adaptadas a partir de um sistema de tampões para microcolunas Beckman.

Em animais mantidos em salinidade de 20‰ e alimentados com a dieta RP, foram identificados os aminoácidos taurina, serina, glutamato, glicina, alanina, prolina, valina, isoleucina, metionina, leucina, tirosina, fenilalanina, lisina, histidina e arginina (dados não apresentados) na hemolinfa dos caranguejos. Com o objetivo de determinar somente os aminoácidos livres que teriam maior papel durante o estresse hiperosmótico, foram quantificados os aminoácidos que apresentaram as concentrações mais elevadas. Os resultados foram expressos como micromoles.

2c. Isolamento e determinação do glicogênio

O isolamento do glicogênio do hepatopâncreas, do músculo da quela e das brânquias anteriores e posteriores seguiu o método descrito por Van Handel (1965) e determinado como glicose após a hidrólise ácida, como descrito por Geary et al. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color). A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos foi expressa em mg/g de tecido úmido.

2d. Determinação da concentração da glicose livre

Os níveis de glicose livre nos diferentes tecidos foram determinados conforme método descrito por Carr e Neff (1984). As amostras dos tecidos foram pesadas, homogeneizadas com uma macerador de tecidos (marca ULTRA TURRAX) em uma solução de citrato de sódio 100mM, fervidas por 10 minutos, agitadas e resfriadas à temperatura ambiente. As amostras foram mantidas a -20 °C por no máximo 72 horas até a dosagem. Com o objetivo de eliminar a interferência dos lipídios foi acrescentada às amostras uma mistura de clorofórmio-metanol (2:1 v/v) na proporção de 2:1 (w/v) e centrifugadas por 10 minutos a 2500 rpm. A concentração de glicose livre foi determinada pelo método enzimático da glicose -oxidase (kit Glicose Enz-Color), na fração intermediária obtida com a centrifugação. Os resultados foram expressos em mg de glicose livre por g de peso úmido de tecido.

3. Procedimentos experimentais *in vitro*

Foram utilizadas amostras do hepatopâncreas, do músculo mandibular e das brânquias anteriores e posteriores de animais submetidos à 24 e 72 horas de estresse hiperosmótico, sob as mesmas condições já descritas para os experimentos *in vivo*. Como grupo controle foram utilizados os animais que permaneceram em aquários com salinidade de 20‰ e mantidos com a dieta RC ou RP.

3a. Captação de glicose

Porções de hepatopâncreas, de músculo mandibular e das brânquias anteriores e posteriores eram retiradas e mantidas em solução fisiológica de caranguejo (SFC) gelada, acrescida de 10 mM de HEPES, pH 7,8. A SFC é constituída de NaCl 400mM; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM; CaCl₂ 25 mM; H₃BO₃ 8,8mM; pH 7,8. Esta SFC foi adaptada ao caranguejo *C. granulata* a partir de Loret (1989).

A metodologia utilizada para o estudo da captação de 2-Deoxi-D-glicose-C¹⁴ foi a descrita por Machado et al. (1982). Os tecidos eram divididos em pequenos pedaços (10-30 mg), sendo que nas brânquias foram feitos pequenos cortes nas lamelas branquiais e as artérias aferente e eferente foram retiradas para possibilitar maior contato do tecido com o meio de incubação. Os tecidos eram colocados em tubos eppendorf de 2 ml, previamente pesados, contendo 500µl de SFC gelada, HEPES 10 mM e 0,2µCi de 2-deoxi-D-glicose-1-¹⁴C (55 mCi/mmol, Amersham International). Os tubos eram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos. A seguir foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:CO₂ , na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff sob agitação constante a 25°C durante 120 minutos. Este tempo de incubação foi determinado por Kucharski (1997) como o tempo mais adequado para a realização desta metodologia em *C. granulata*. Após o período de incubação, as reações teciduais eram interrompidas em banho de gelo, as amostras de tecido eram retiradas do

meio de incubação, lavadas três vezes em SFC gelada, secas em papel filtro e colocadas em tubos pirex com tampa, contendo 1 ml de água bi-destilada. Os tubos foram congelados a -20°C e depois fervidos por 30 minutos. Este procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, com o objetivo de romper as células e ocorrer a liberação da radioatividade captada pelas células, sendo que este meio foi considerado o meio interno. O meio de incubação foi considerado o meio externo.

Amostras de $100\mu\text{l}$ do meio interno ou externo foram dissolvidas em 5 ml de coquetel de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) mais $500\mu\text{l}$ de água bi-destilada para corrigir a turvação. A radioatividade foi medida com um contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T/M: dpm/ml meio interno por dpm/ml do meio de incubação).

3b. Síntese de proteínas

O efeito das dietas RC e RP e do estresse hiperosmótico sobre a síntese de proteínas foi determinado segundo método descrito por Richardson et al. (1997). Porções (40-100 mg) de hepatopâncreas, de músculo mandibular e de brânquias anteriores e posteriores foram colocadas em tubos de 2 ml contendo $500\mu\text{l}$ SFC gelada (pH 7,8) acrescida de 10mM HEPES, 0,1mM fenilmetilsufonil fluoride (PMSF), $0,2\mu\text{Ci}$ de L-leucina- $\text{U-}^{14}\text{C}$ (310 mCi/mmol – Amersham International) e 5mM L-leucina. Nestes experimentos também

foram feitos cortes nas lamelas branquiais das brânquias anteriores e posteriores, e as artérias aferente e eferente foram retiradas.

Os tubos eram aerados por 30 segundos com carbogênio ($O_2:CO_2$, 95:5% v/v) e incubados em banho metabólico 25 °C sob agitação constante. Em experimento piloto, utilizando-se o hepatopâncreas, o músculo e as brânquias anteriores e posteriores de animais alimentados com a dieta RP, foram testados os tempos de uma, três e seis horas sobre a síntese de proteínas. Foi escolhido o tempo de quatro horas (Figuras 1 e 2) para a realização dos experimentos .

Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais eram interrompidas em banho de gelo, os tecidos lavados por três vezes em SFC gelada para tirar o excesso de radioatividade, secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 500 μ l de água bidestilada. As amostras foram homogeneizadas com um macerador de tecidos (Marca OMNI MIXER), uma parte da amostra foi processada para a quantificação das proteínas totais (Lowry et al., 1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. A outra parte foi processada para a quantificação ^{14}C -proteínas totais. Um volume de 250 μ l das amostras foi pipetado em filtros de microfibras de vidro (GF/B, 24mm, Whatman). Os filtros foram lavados em TCA 10% por 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das ^{14}C -proteínas. A seguir, os filtros foram lavados duas vezes em álcool 95% e duas vezes em éter. Quando secos, os filtros foram embebidos em 5 ml de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade

quantificada em contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos em nmoles de L-U-leucina-¹⁴C incorporada em proteínas por mg proteína por tempo de incubação.

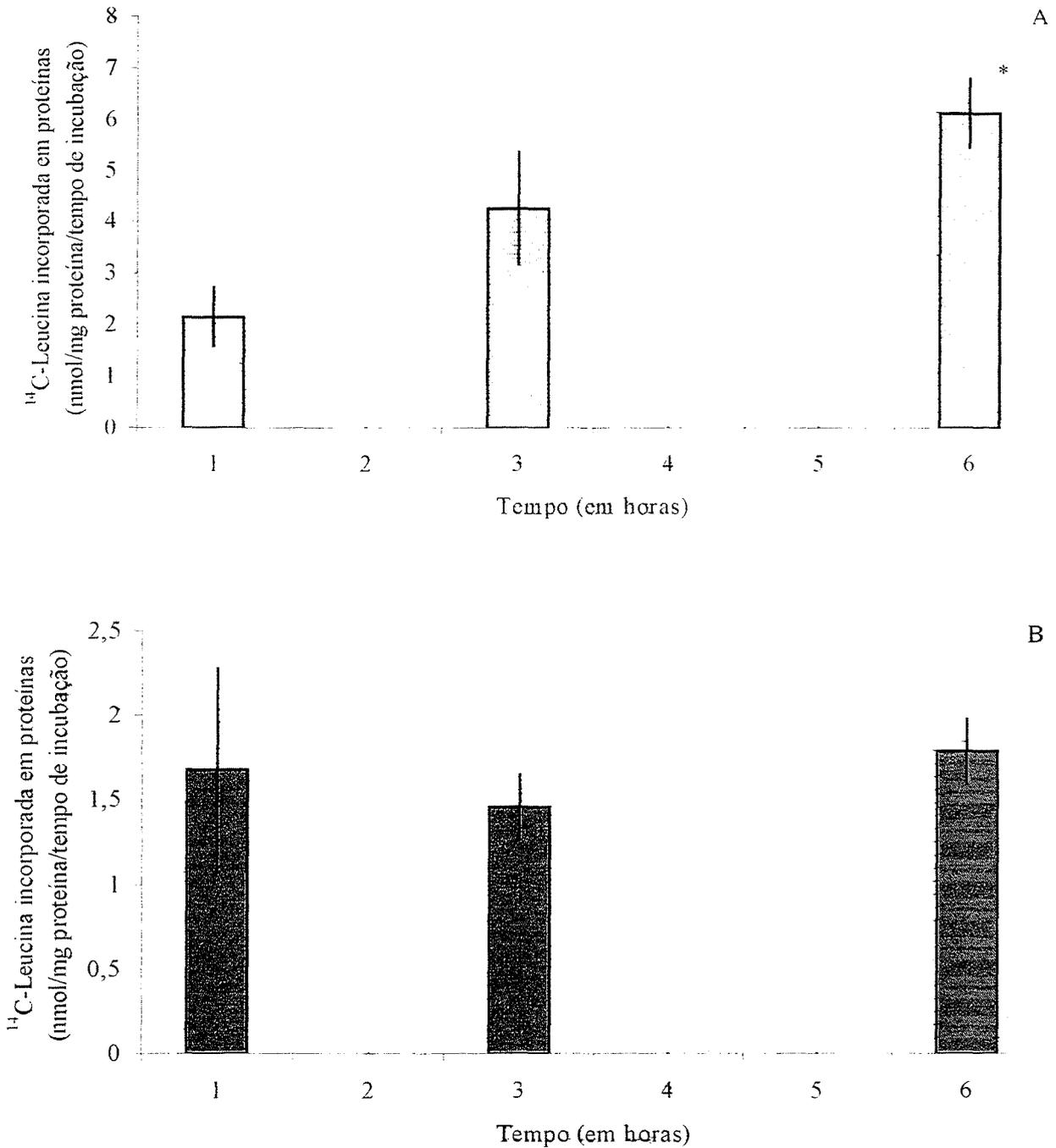


Figura 1: Efeitos de diferentes tempos de incubação sobre a síntese de proteínas a partir de L-leucina-U- ^{14}C - no (A) hepatopâncreas e (B) músculo de *Chasmagnathus granulata* alimentados previamente com uma dieta rica em proteínas. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a 1 hora de incubação.

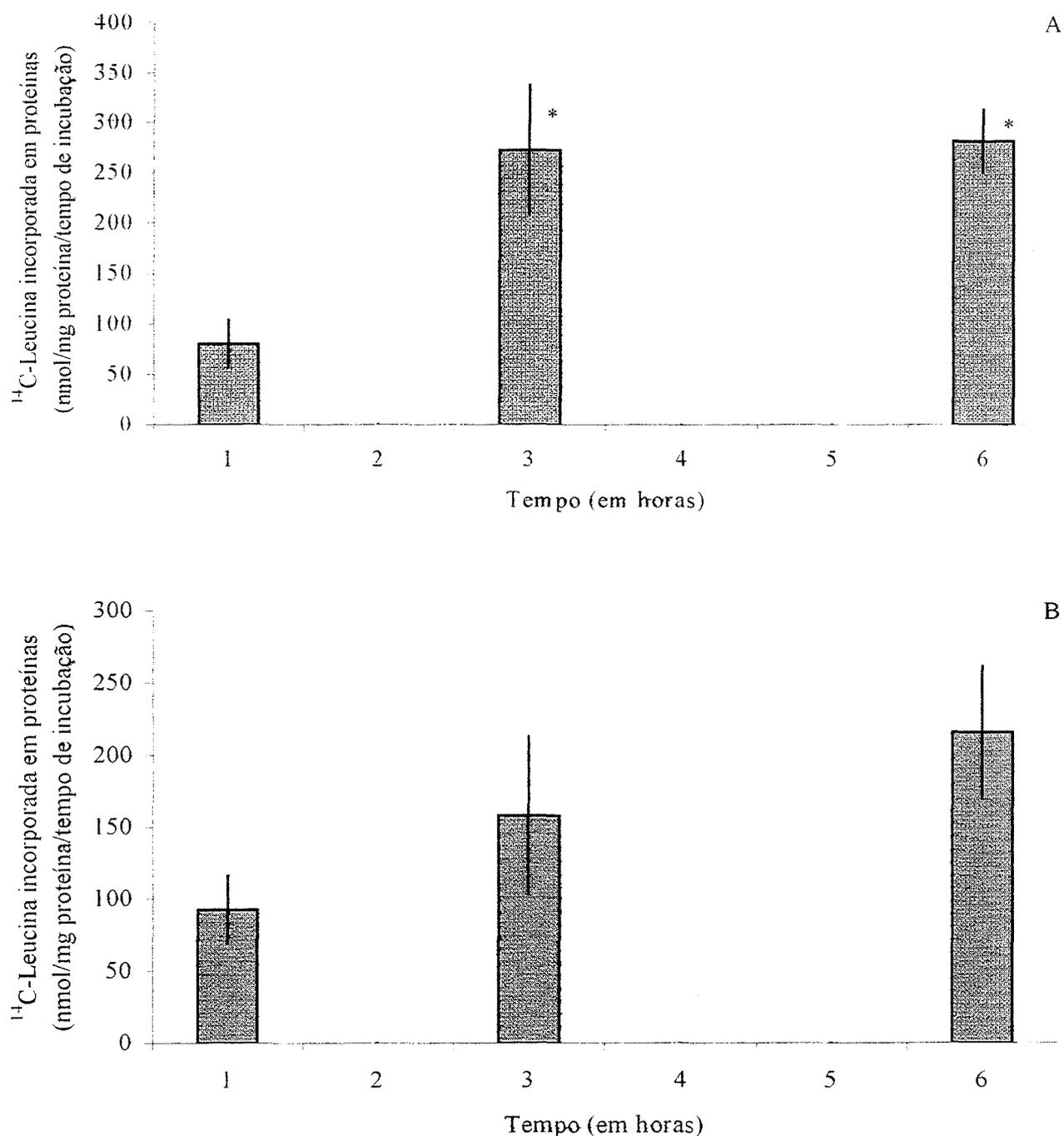


Figura 2: Efeitos de diferentes tempos de incubação sobre a síntese de proteínas a partir de L-leucina- ^{14}C nas (A) brânquias anteriores e (B) posteriores de *Chasmagnathus granulata* alimentados previamente com uma dieta rica em proteínas. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação a 1 hora de incubação.

4. Tratamento estatístico

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos (\pm) o erro padrão da média (EPM). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois pontos foi feita usando o teste t de Student para dados não pareados. Para as curvas de tempo, onde os grupos foram tratados com a dieta RC ou RP, foram utilizadas a análise de variância (ANOVA) de uma via e duas vias, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas se os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat compatível com Windows 95 (versão 2.0).

RESULTADOS

1. Efeito de diferentes períodos de estresse hiperosmótico sobre o metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata* alimentado com uma dieta rica (RC) em carboidratos ou proteínas (RP)

1.1 Concentração de glicose na hemolinfa ao longo do choque hiperosmótico

As concentrações hemolinfáticas de glicose nos diferentes períodos do choque osmótico estão representadas na figura 3. Nos animais alimentados com a dieta RC observa-se um aumento de 40% na concentração de glicose às 144 horas de estresse hiperosmótico ($P < 0,05$). No grupo alimentado com a dieta RP não foram observadas variações significativas dos níveis de glicose na hemolinfa durante o período experimental estudado.

A concentração de glicose na hemolinfa dos animais do grupo controle alimentado com a dieta RC foi 2 vezes ($p < 0,05$) maior do que aquela dos caranguejos alimentados com a dieta RP.

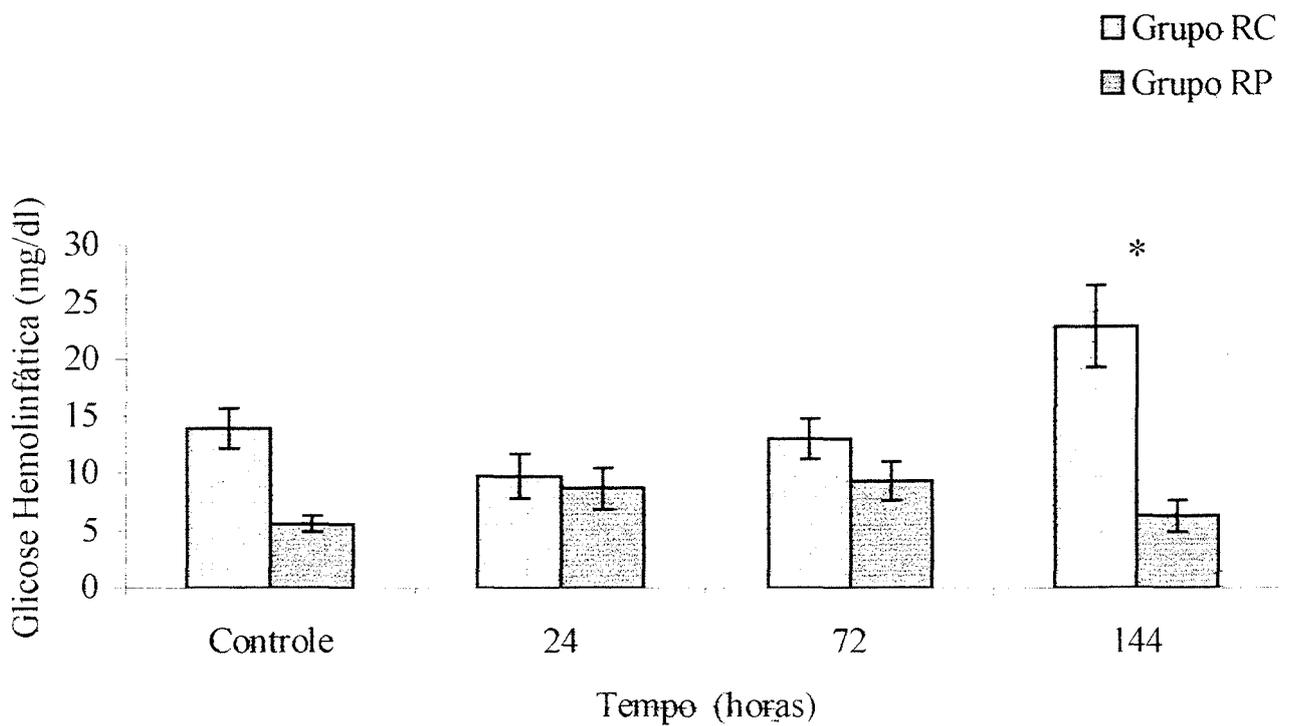


Figura 3. Concentração hemolinfática de glicose em caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, a média \pm EPM de 4-38 animais. O asterisco representa a diferença significativa de ($P < 0,05$) em relação ao controle.

1.2 Concentração de glicose livre e de glicogênio no hepatopâncreas ao longo do estresse hiperosmótico

Os resultados dos níveis de glicose livre no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com a dieta RC ou RP e submetidos a diferentes períodos de estresse hipersalino estão representados na figura 4. No tecido hepatopancreático dos animais submetidos a dieta RC não foram verificadas alterações significativas na concentração de glicose livre, embora, ocorra um aumento de 28% às 24 horas e de 35% ($p>0,05$) às 72 horas de estresse. Os animais que foram submetidos à dieta RP aumentaram em 40% ($p<0,05$) os níveis de glicose livre às 72 horas. Contudo, às 144 horas de estresse, os valores de glicose livre diminuíram a valores 48% ($p>0,05$) menores que aqueles do grupo controle. Não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais, ao longo do estresse hiperosmótico.

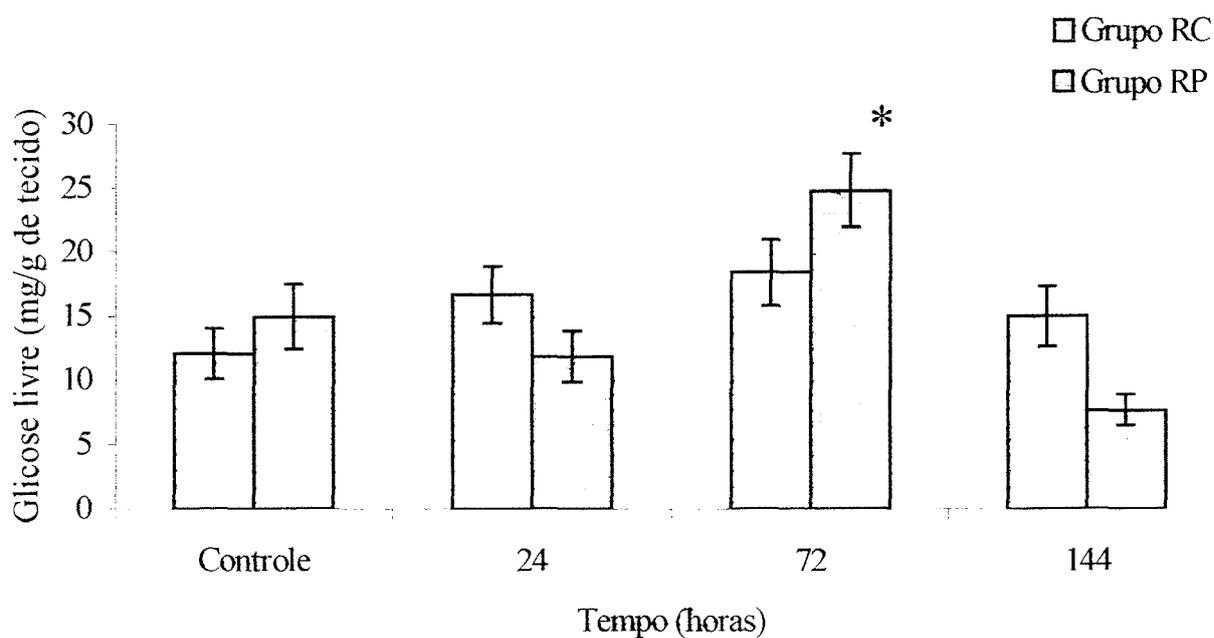


Figura 4. Níveis de glicose livre no hepatopâncreas de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3-7 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

A concentração de glicogênio no hepatopâncreas de animais alimentados com a dieta RC ou RP e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico pode ser vista na figura 5. No grupo RC não foram constatadas alterações significativas da concentração de glicogênio às 24 e 72 horas de estresse, entretanto, às 144 horas foi verificado um aumento da concentração de glicogênio hepatopancreático de 49% ($p>0,05$) em relação ao grupo controle. No grupo RP a concentração de glicogênio no hepatopâncreas diminuiu 60% ($p>0,05$) nas primeiras 24 horas de estresse. Contudo, às 72 e 144 horas de estresse hiperosmótico os valores foram semelhantes aqueles do grupo controle. Foram verificadas diferenças significativas ($p<0,05$) da concentração de glicogênio entre os animais mantidos com as diferentes dietas.

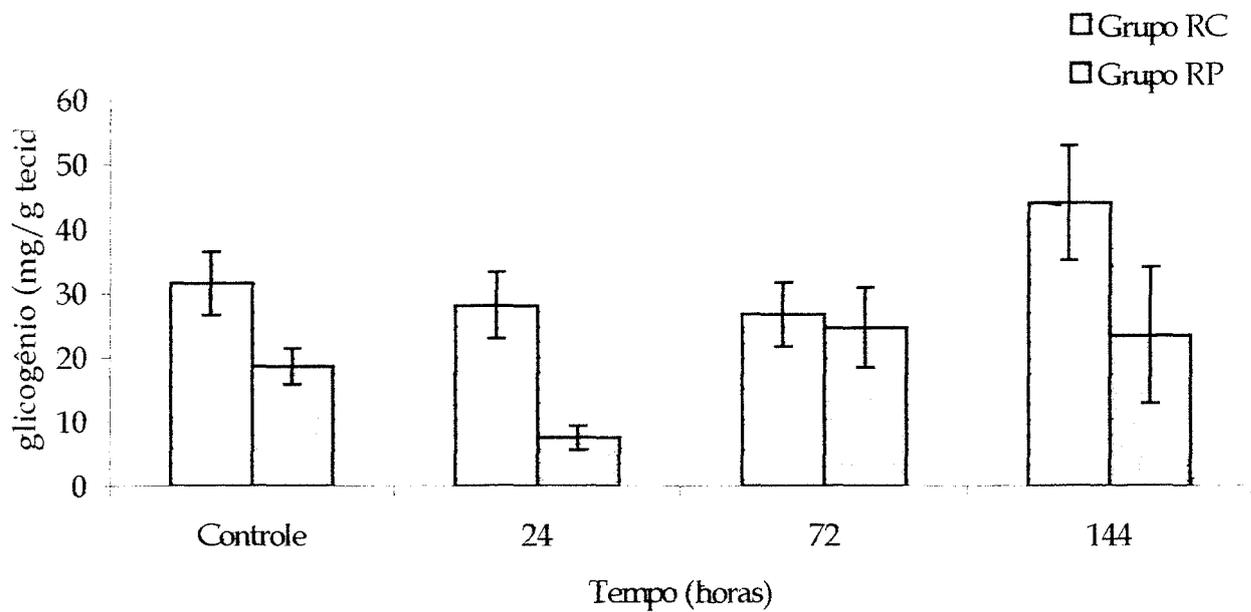


Figura 5. Níveis de glicogênio no hepatopâncreas de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3-9 animais

1.3. Efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de glicose no hepatopâncreas

Os resultados do efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de 2-Deoxi-D-glicose-1-¹⁴C no hepatopâncreas de *C. granulata* adaptado à dieta RC ou RP, estão representados na figura 6.

Quando comparadas as duas dietas, verifica-se que os animais do grupo controle RC e RP têm a mesma capacidade de captar glicose. Entretanto, durante o estresse hipersalino, a captação de glicose pelo hepatopâncreas do grupo RC foi aproximadamente 60% ($P < 0,05$) maior que aquela do grupo controle. No grupo RP não foram constatadas alterações significativas dos valores de captação de glicose às 72 horas de estresse hiperosmótico.

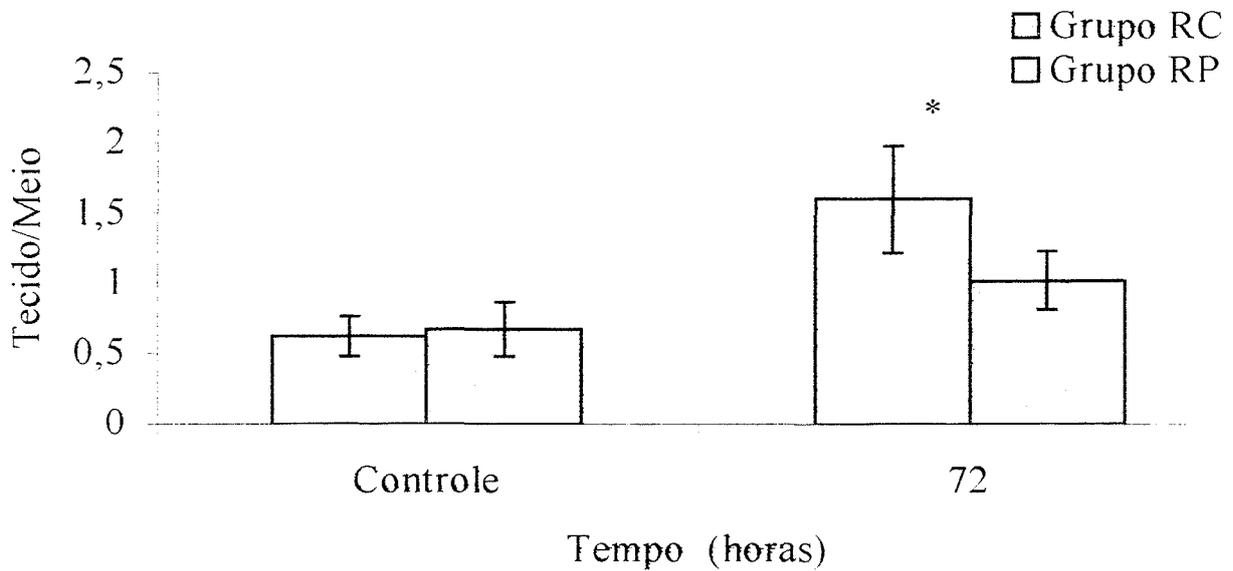


Figura 6. Captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C no hepatopâncreas de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 5-6 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

1.4 Concentração de glicose livre e de glicogênio no músculo ao longo do estresse hiperosmótico

Na figura 7 estão representados os valores de glicose livre no músculo de caranguejos alimentados com a dieta RP ou RC e submetidos ao choque hiperosmótico. Não foram verificadas diferenças significativas dos níveis de glicose livre em ambos os grupos experimentais ao longo do estresse hipersalino, embora no grupo RC tenha ocorrido um aumento de 30% dos níveis de glicose livre, às 72 e 144 horas.

Quando comparados os valores de glicose livre no músculo dos animais mantidos com a dieta RC com aqueles do grupo mantidos com a dieta RP, não foram verificadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais.

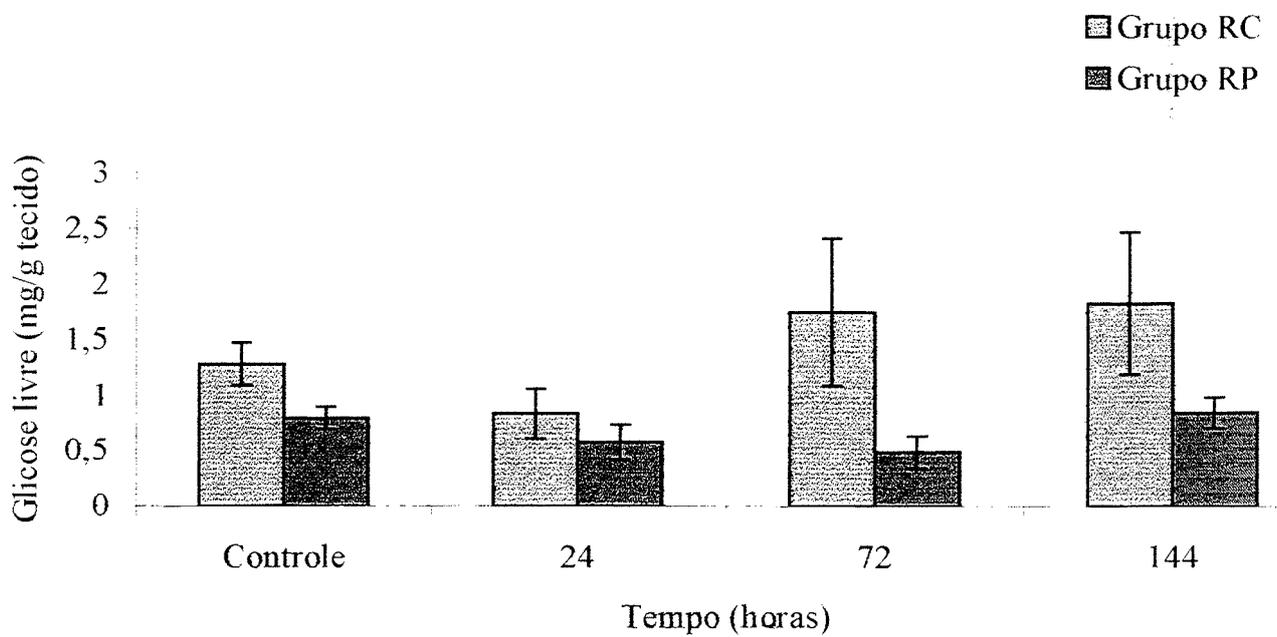


Figura 7. Níveis de glicose livre no músculo de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-9 animais.

Na figura 8 estão representados os níveis de glicogênio no músculo de animais alimentados com uma dieta RC ou RP e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. Nos caranguejos alimentados com a dieta RC, a concentração de glicogênio aumentou cerca de 3,7 vezes às 24 horas de estresse ($p < 0,05$). Entretanto, às 72 e 144 horas, os níveis de glicogênio diminuíram gradualmente, atingindo valores semelhantes aqueles do grupo controle. Nos animais alimentados previamente com a dieta RP, não foram verificadas alterações significativamente da concentração de glicogênio no músculo ao longo do período experimental estudado.

Comparando-se os valores da concentração de glicogênio muscular entre os animais mantidos com a dieta RC e aqueles alimentados com a dieta RP, constata-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos experimentais ao longo do tempo.

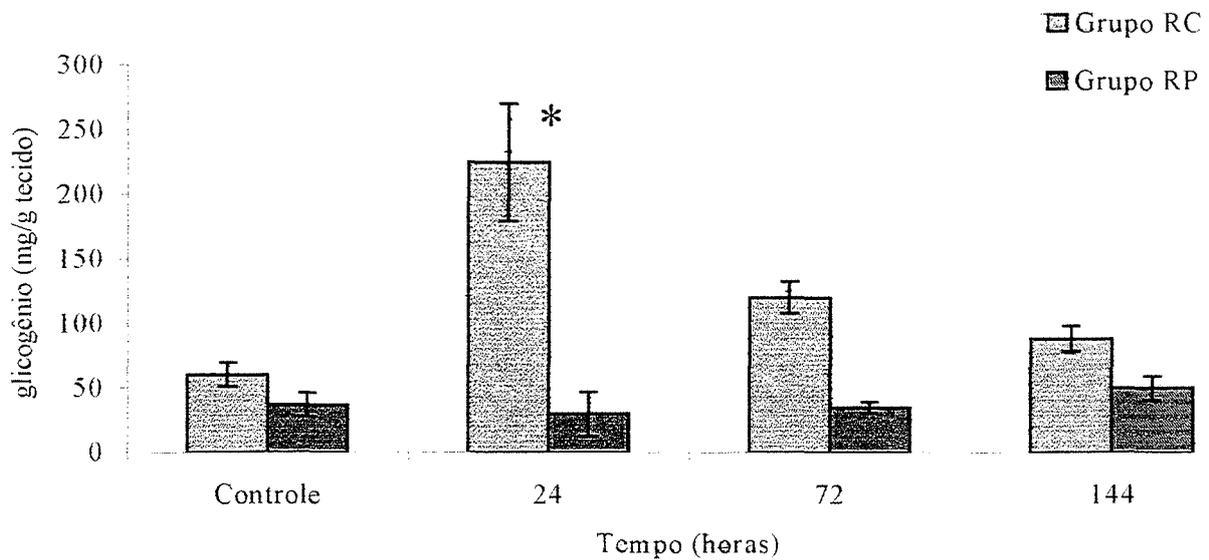


Figura 8. Níveis de glicogênio no músculo de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 6-8 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

1.5 Efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de glicose no músculo

Na figura 9 estão representados os valores da captação de glicose pelo músculo de *C. granulata* alimentado com a dieta RC ou RP e submetido à 72 horas de estresse hiperosmótico. No grupo RC não foram verificadas diferenças significativas dos valores de captação de glicose durante o estresse hipersalino de 72 horas. Já no grupo RP, houve um aumento da captação de glicose ($p > 0,05$) de cerca de 56% às 72 horas de choque osmótico. A comparação entre os valores de captação de glicose dos animais controle alimentados com a dieta RC com aqueles mantidos com a dieta RP não demonstra diferença significativa ($p > 0,05$). Entretanto, às 72 horas de estresse os animais do grupo RP captam aproximadamente 48% a mais de glicose ($p < 0,05$) que aqueles do grupo RC.

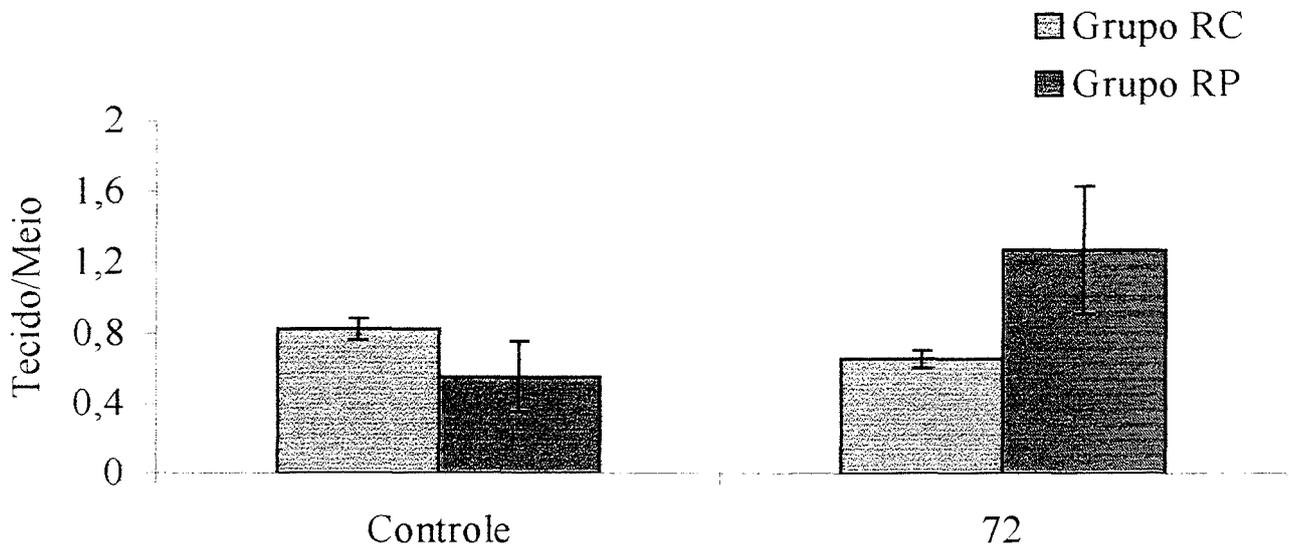


Figura 9. Captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴ C no músculo de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM 3-4 animais.

1.6 Concentração de glicose livre e de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores ao longo do estresse hiperosmótico

A figura 10 representa os níveis de glicose livre nas brânquias anteriores ao longo do choque hiperosmótico. Nos caranguejos alimentados com a dieta RC, não foram constatadas variações significativas dos valores de glicose livre nas brânquias anteriores quando comparados com aqueles obtidos no grupo controle. Nos caranguejos mantidos com a dieta RP, verifica-se que às 24 horas ocorreu um aumento de cerca de 49% ($p < 0,05$) dos níveis de glicose livre nas brânquias anteriores. Entretanto, às 72 horas de choque osmótico, os níveis de glicose diminuíram, atingindo valores semelhantes aqueles encontrados no grupo controle às 144 horas de estresse. Comparando os valores de glicose livre nas brânquias anteriores entre os animais mantidos com as dietas RC e RP não foram constatadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais.

As variações da concentração de glicogênio nas brânquias anteriores dos caranguejos alimentados com a dieta RC ou RP e submetidos ao choque hipersalino podem ser vistas na figura 11. No grupo que recebeu a dieta RC não foram constatadas variações significativas dos níveis de glicogênio branquial ao longo do período experimental estudado. No grupo que recebeu a dieta RP, foi verificado um aumento de 61% ($p < 0,05$) às 72 horas de estresse que se manteve significativamente mais elevado ($p < 0,05$) até o final do período experimental. A administração de uma dieta RC ou RP

determina diferenças significativas ($p < 0,05$) das concentrações de glicogênio nas brânquias anteriores.

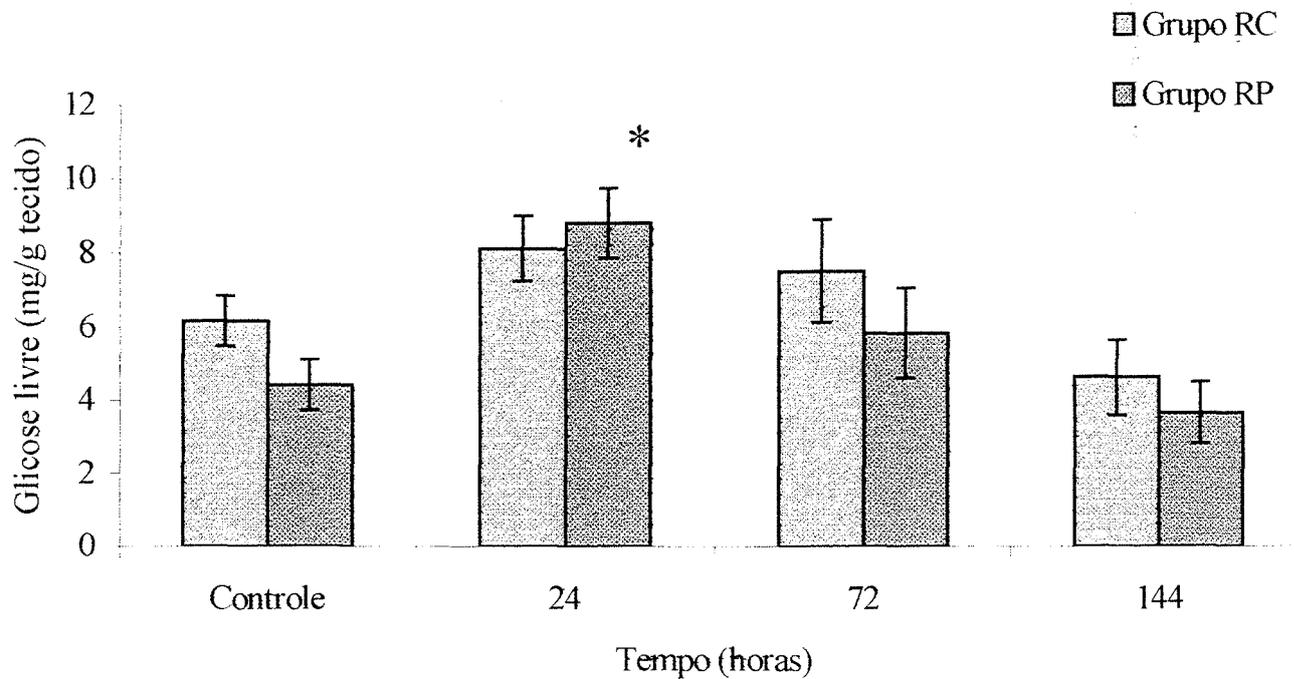


Figura 10. Níveis de glicose livre nas brânquias anteriores de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 5-9 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

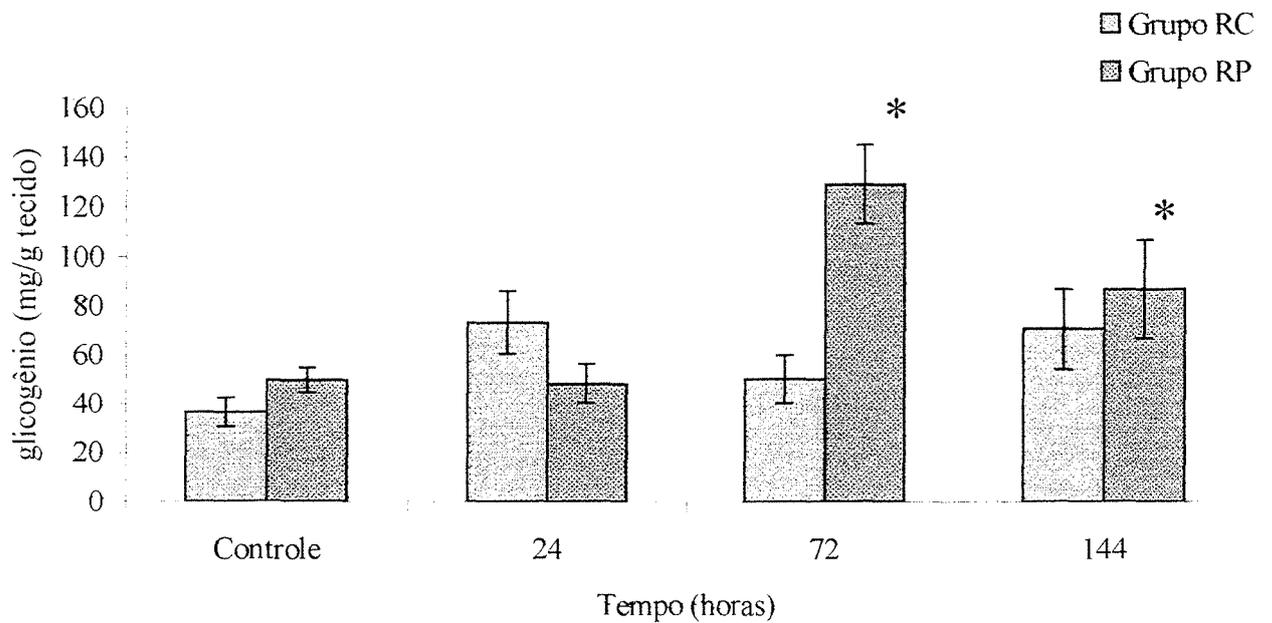


Figura 11. Níveis de glicogênio nas brânquias anteriores de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-9 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

Os valores de glicose livre encontrados nas brânquias posteriores de caranguejos alimentados com a dieta RC ou RP e submetidos a diferentes períodos de estresse hipersalino estão representados na figura 12. O perfil dos níveis de glicose livre encontrados nas brânquias posteriores ao longo do estresse osmótico, assemelha-se aquele verificado nas brânquias anteriores. Os animais tratados com a dieta RC não apresentaram modificações significativas dos níveis de glicose livre ao longo do estresse, embora, às 24 horas os valores de glicose livre tenham sido 1,6 vezes maiores ($p > 0,05$) que aqueles do grupo controle. Nas brânquias posteriores dos animais adaptados à dieta RP, 24 horas de estresse hiperosmótico aumentam em 2 vezes ($p < 0,05$) a concentração de glicose livre neste tecido. A partir das 72 horas de estresse, os níveis de glicose livre retornam a valores semelhantes aqueles do grupo controle. A comparação entre os grupos tratados com a dieta RC e aqueles submetidos à dieta RP não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos.

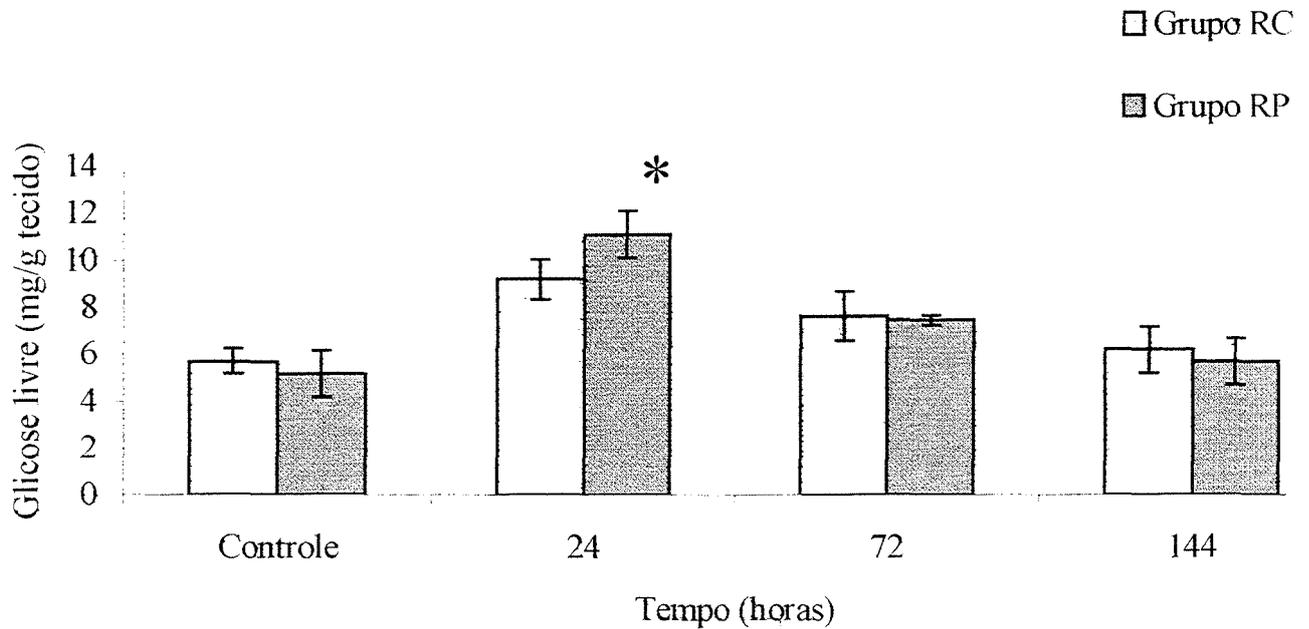


Figura 12. Níveis de glicose livre nas brânquias posteriores de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3-9 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

Na figura 13 estão representados os valores de glicogênio nas brânquias posteriores dos caranguejos alimentados com a dieta RC ou RP e submetidos ao choque hiperosmótico. No grupo RC não foram constatadas alterações significativas da concentração de glicogênio nas brânquias posteriores ao longo de todo o período experimental. Já no grupo RP, constata-se um aumento de 58% ($P < 0,05$) às 72 horas de estresse, entretanto, às 144 horas, os valores da concentração de glicogênio foram semelhantes aqueles do grupo controle.

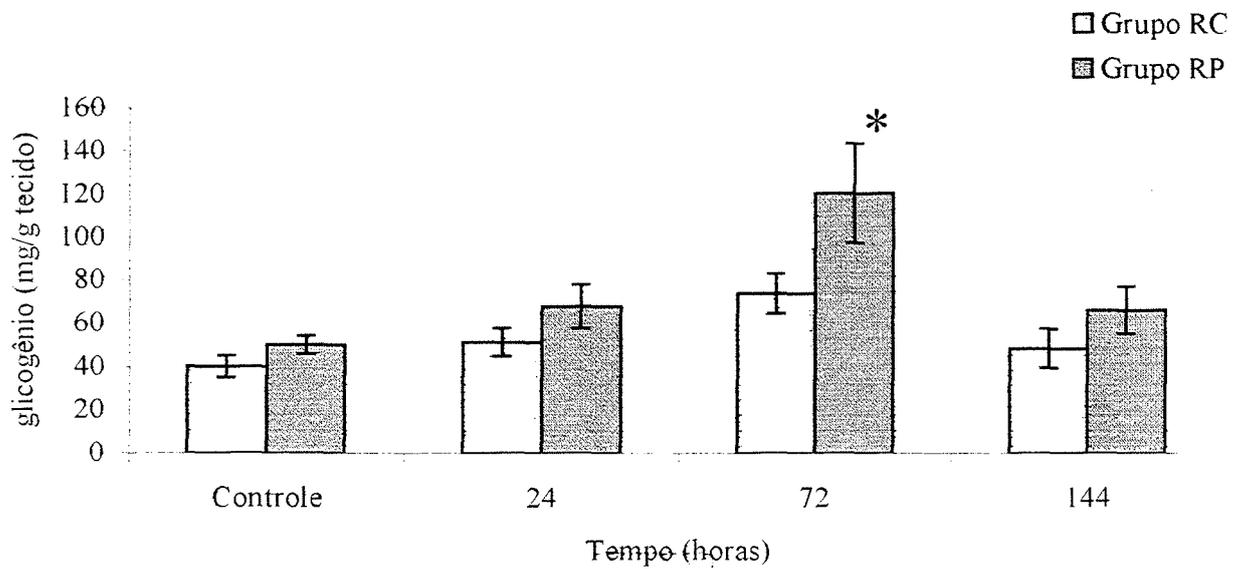


Figura 13. Níveis de glicogênio nas brânquias posteriores de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos a diferentes períodos de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-9 animais. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

1.7 Efeito de 72 horas de estresse hiperosmótico sobre a captação de glicose nas brânquias anteriores e posteriores

Os resultados da captação de glicose pelas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos adaptados à dieta RC ou RP e submetidos ao choque hiperosmótico são apresentados na figura 14 e 15, respectivamente. Em ambos os tecidos, não foram constatadas alterações significativas da captação de glicose após 72 horas de choque hiperosmótico.

A administração da dieta RC ou RP não alterou significativamente a captação de glicose em ambas as brânquias.

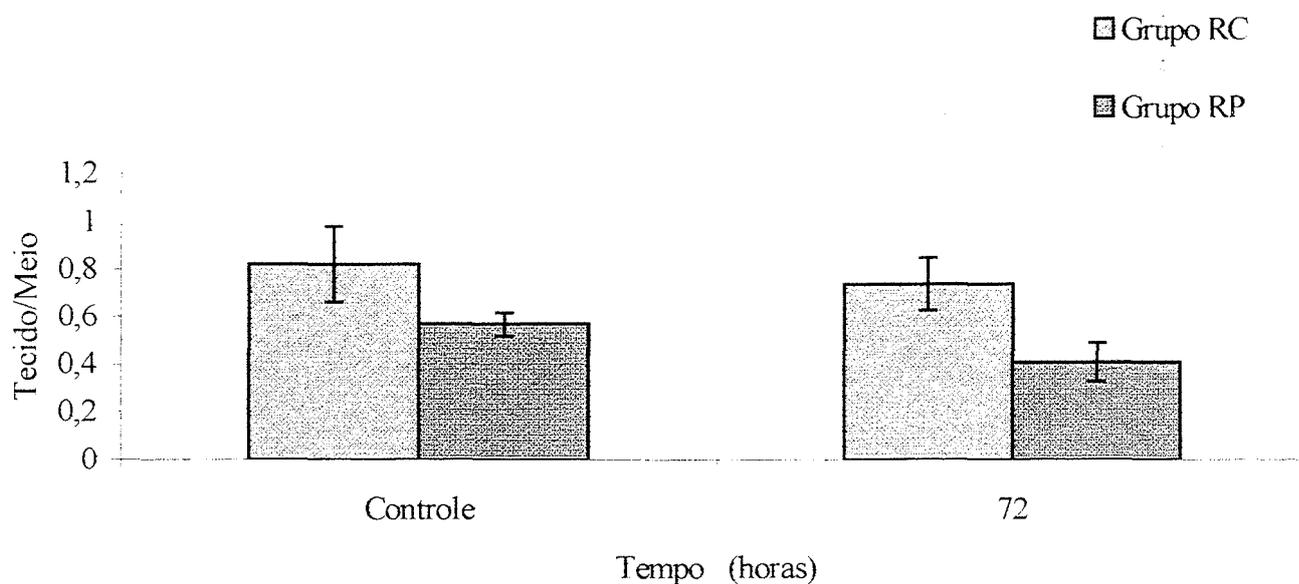


Figura 14. Captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C nas brânquias anteriores de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos à 72 horas de estresse hiperomótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3-7 animais.

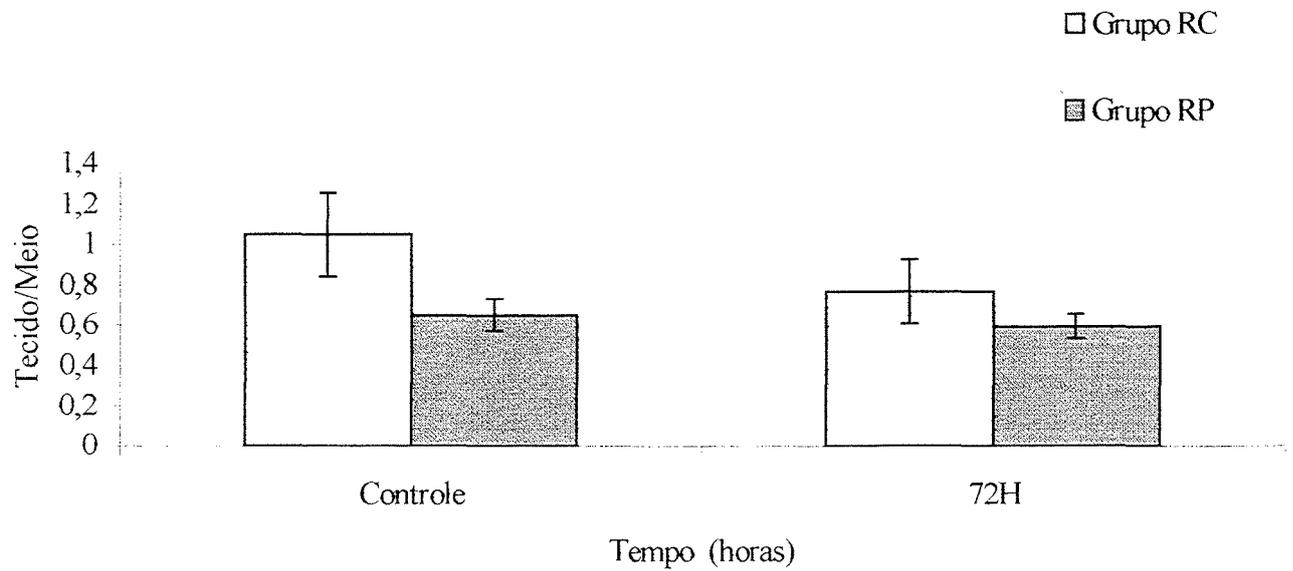


Figura 15. Captação de 2-Deoxi-D-Glicose-1-¹⁴C nas brânquias posteriores de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras representam respectivamente, as médias \pm EPM de 3-6 animais.

2. Efeito de diferentes períodos de estresse hiperosmótico sobre o metabolismo de compostos nitrogenados no caranguejo *Chasmagnathus granulata* alimentado com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas

2.1. Concentração de aminoácidos na hemolinfa ao longo do choque hiperosmótico

As concentrações dos aminoácidos glicina, serina, arginina, alanina e prolina determinados na hemolinfa de caranguejos adaptados à dieta RC e submetidos à 24 e 72 horas de estresse hiperosmótico estão representadas na figura 16 e tabela 2.

Em relação ao aminoácido glicina, verifica-se às 24 e 72 horas, uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da concentração hemolinfática em 62% e 52%, respectivamente. A concentração hemolinfática da arginina diminuiu 70% ($p > 0,05$) às 24 horas quando comparada àquela do grupo controle. Também, a serina hemolinfática reduziu a concentração em cerca de 40% ($p > 0,05$) às 72 horas de estresse. Estes valores não foram significativos devido ao número de animais ($N=3$). As concentrações dos aminoácidos alanina e prolina não sofreram alterações marcantes ($p > 0,05$) ao longo do estresse hiperosmótico.

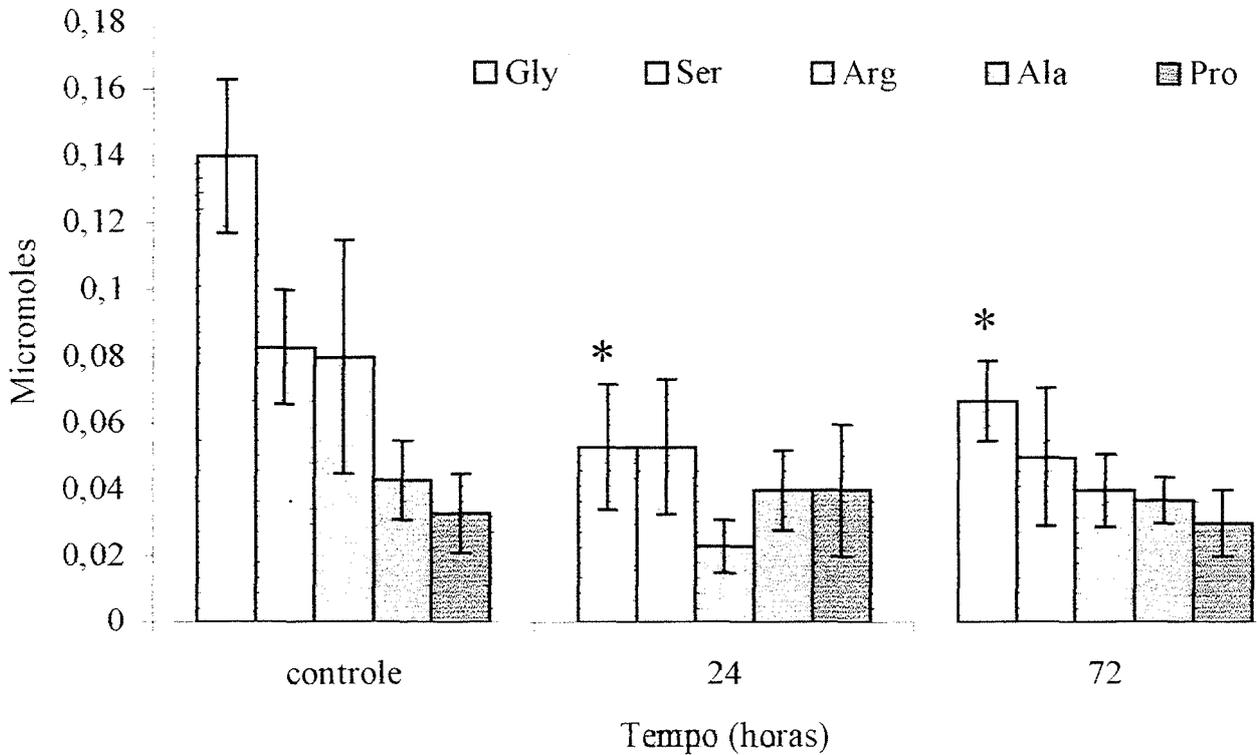


Figura 16. Concentração de aminoácidos na hemolinfa de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos e submetidos ao estresse hiperosmótico de 24 e 72 horas. As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle.

A figura 17 e tabela 2 apresentam os resultados do efeito de dieta RP e do estresse hiperosmótico de 24 e 72 horas sobre as concentrações dos aminoácidos glicina, serina, arginina, alanina e prolina na hemolinfa de *C. granulata*.

Não foram verificadas diferenças significativas das concentrações dos aminoácidos determinados na hemolinfa de caranguejos adaptados à dieta RP nos dois tempos de estresse osmótico estudados. Contudo, observa-se que a arginina, alanina e prolina aumentam durante o estresse osmótico suas concentrações em cerca de 2 a 3 vezes em relação aos animais controles, já a glicina diminui em cerca de 40% às 72 horas de choque hiperosmótico. Provavelmente, devido ao número reduzido de animais (N=3) e ao erro padrão, estes valores não foram estatisticamente significativos.

Não foram constatadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas concentrações de alanina, glicina, serina, prolina e arginina entre os animais do grupo controle alimentado com a dieta RC e aqueles mantidos com a dieta RP.

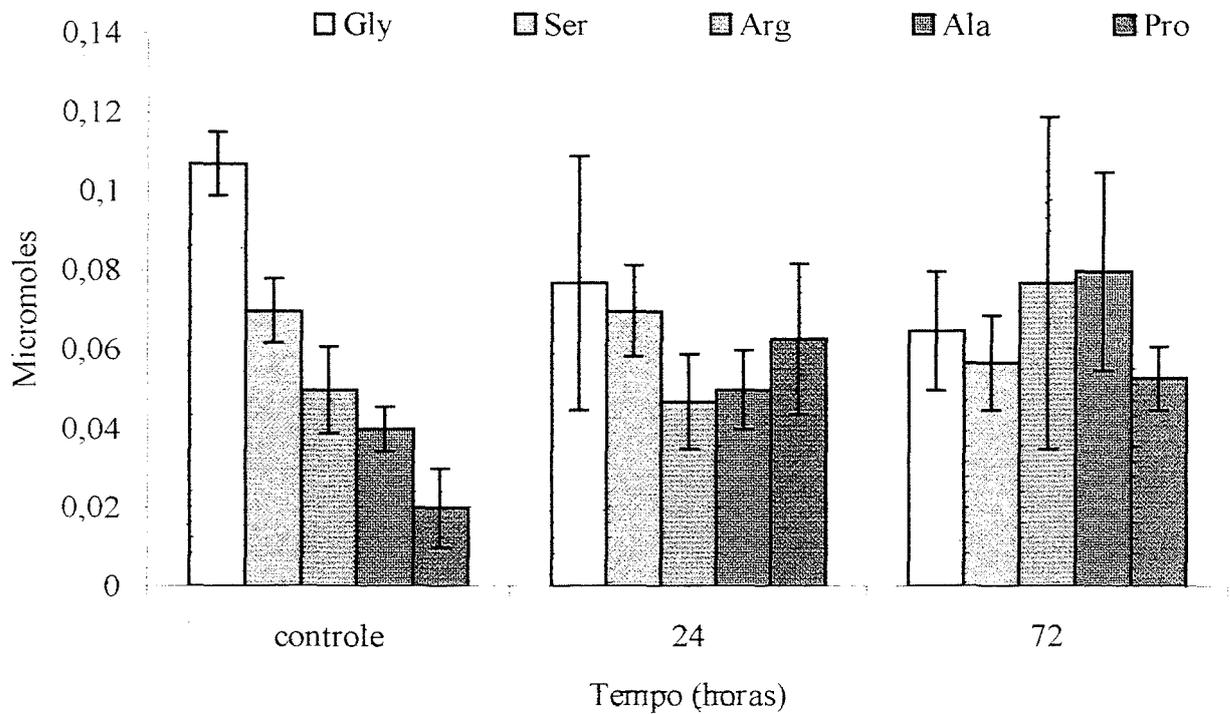


Figura 17. Concentração de aminoácidos na hemolinfa de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em proteínas e submetidos ao estresse hiperosmótico de 24 e 72 horas. As colunas e barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 3 animais.

TABELA 2. Efeito da dieta RC ou RP sobre a concentração de aminoácidos na hemolinfa de caranguejos submetidos à 24, 72 e 144 horas de estresse hiperosmótico.

Concentração de aminoácidos na hemolinfa de <i>C. granulata</i> (micromoles)						
	controle		24 horas		72 horas	
	dieta RC	dieta RP	dieta RC	dieta RP	Dieta RC	dieta RP
glicina	0,140±0, 023 (3)	0,107±0, 008 (3)	0,053±0, 019* (3)	0,077±0, 032 (3)	0,067±0, 012 * (3)	0,065±0, 015 (3)
serina	0,083±0, 017 (3)	0,067±0, 008 (3)	0,053±0, 020 (3)	0,067±0, 008 (3)	0,050±0, 021 (3)	0,057±0, 012 (3)
arginina	0,080±0, 035 (3)	0,050±0, 011 (3)	0,023±0, 008 (3)	0,050±0, 011 (3)	0,040±0, 011 (3)	0,077±0, 042 (3)
alanina	0,043±0, 012 (3)	0,040±0, 006 (3)	0,040±0, 012 (3)	0,050±0, 010 (3)	0,037±0, 007 (3)	0,080±0, 025 (3)
prolina	0,033±0, 012 (3)	0,020±0, 01 (3)	0,040±0, 002 (2)	0,063±0, 018 (3)	0,030±0, 01 (3)	0,053±0, 008 (3)

Os valores representam a média ± EPM, () representa o número de animais,

* representa $P < 0,05$.

2.2. Estudo *in vitro* da síntese de ^{14}C -proteínas no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos adaptados à dieta RC ou RP e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico

Na figura 18 estão representados os resultados da incorporação de L-leucina- $U\text{-}^{14}\text{C}$ em ^{14}C -proteínas no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com a dieta RC ou RP, e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico.

Nos animais alimentados previamente com a dieta RC, a capacidade de síntese de proteínas aumentou 45% ($p < 0,05$) com 72 horas de estresse hipersalino. Também, no grupo alimentado com a dieta RP, verifica-se que a capacidade de síntese de proteínas aumenta em cerca de 1,7 vezes ($p < 0,05$) em relação àquela do grupo controle. Não foram verificadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na síntese de proteínas pelo hepatopâncreas, entre os animais tratados com a dieta RC ou RP.

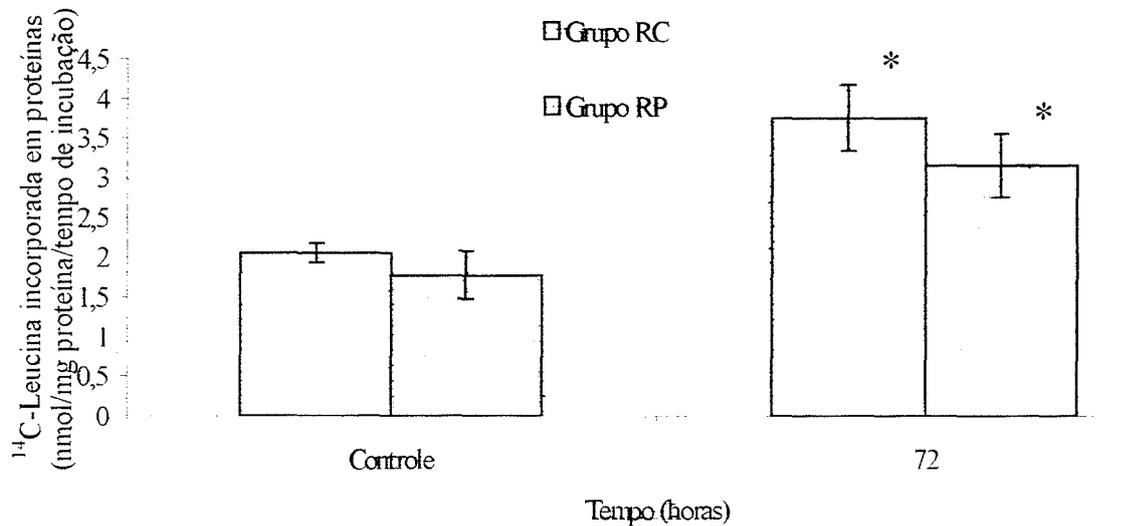


Figura 18. Síntese de ^{14}C -proteína a partir de L-leucina- ^{14}C pelo hepatopâncreas de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-7 animais. Os asteriscos representam as diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao controle.

Os valores da síntese de proteínas pelo músculo de caranguejos adaptados à dieta RC ou RP encontram-se na figura 19. No grupo tratado com a dieta RC, não foram verificadas variações significativas ($p > 0,05$) da capacidade de síntese de proteínas no tempo experimental estudado. Já o grupo tratado com a dieta RP aumentou a capacidade de síntese em 45% ($p < 0,05$) às 72 horas de estresse hiperosmótico.

No músculo, não foram verificadas diferenças significativas da síntese de proteínas entre os animais mantidos com a dieta rica em carboidratos e aqueles alimentados com a dieta rica em proteínas.

A figura 20 demonstra os valores da incorporação de L-leucina- $U-^{14}C$ em ^{14}C -proteínas nas brânquias anteriores de caranguejos adaptados à dieta RC ou RP e submetidos ao estresse hiperosmótico por 72 horas.

Não foram constatadas diferenças significativas na síntese de proteínas pelas brânquias anteriores após 72 horas de estresse osmótico, tanto nos animais tratados com a dieta RC como naqueles mantidos com a dieta RP. A comparação dos valores da capacidade de síntese de proteínas entre os grupos controles, também não demonstra diferença significativa ($p > 0,05$) entre as dietas RC e RP.

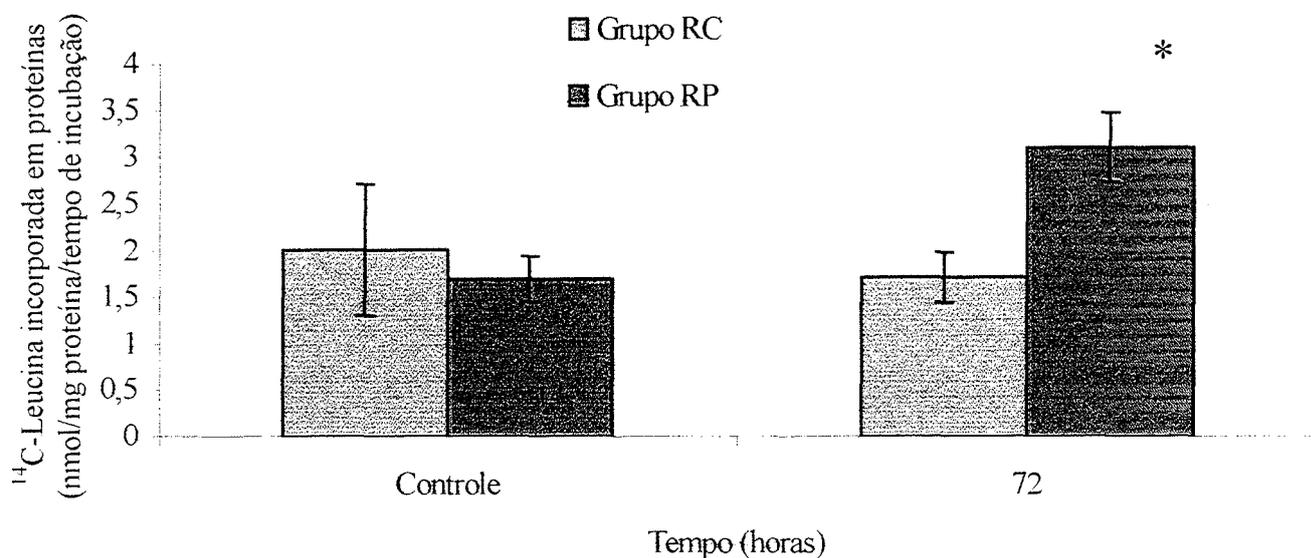


Figura 19. Síntese de ¹⁴C-proteína a partir de L-leucina-U-¹⁴C pelo músculo mandibular de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RC), e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-7 animais. Os asteriscos representam as diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação ao controle.

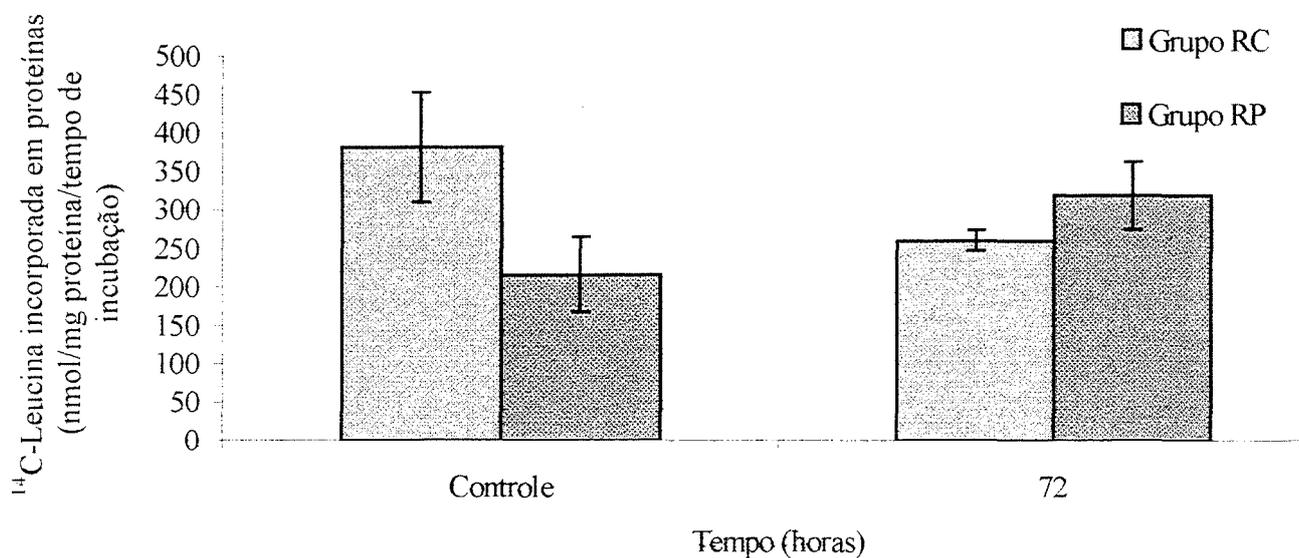


Figura 20. Síntese de ^{14}C -proteína a partir de L-leucina- $U\text{-}^{14}\text{C}$ pelas brânquias anteriores de caranguejos alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP), e submetidos à 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-5 animais.

Na figura 21 está ilustrada a capacidade de síntese de proteínas pelas brânquias posteriores de caranguejos mantidos com a dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos ao choque hiperosmótico por 72 horas.

Após 72 horas de estresse hiperosmótico, verifica-se que as brânquias posteriores dos animais tratados com a dieta RC, não alteraram sua capacidade de síntese proteica. Entretanto, as brânquias posteriores dos animais tratados com a dieta RP, tiveram um aumento de 60% da capacidade de síntese de proteínas às 72 horas de estresse hiperosmótico. A comparação da capacidade de síntese de proteínas, entre os grupos controles tratados previamente com a dieta RC ou RP, e entre os grupos submetido ao choque osmótico, demonstra que não houve diferenças significativas entre ambos tratamentos.

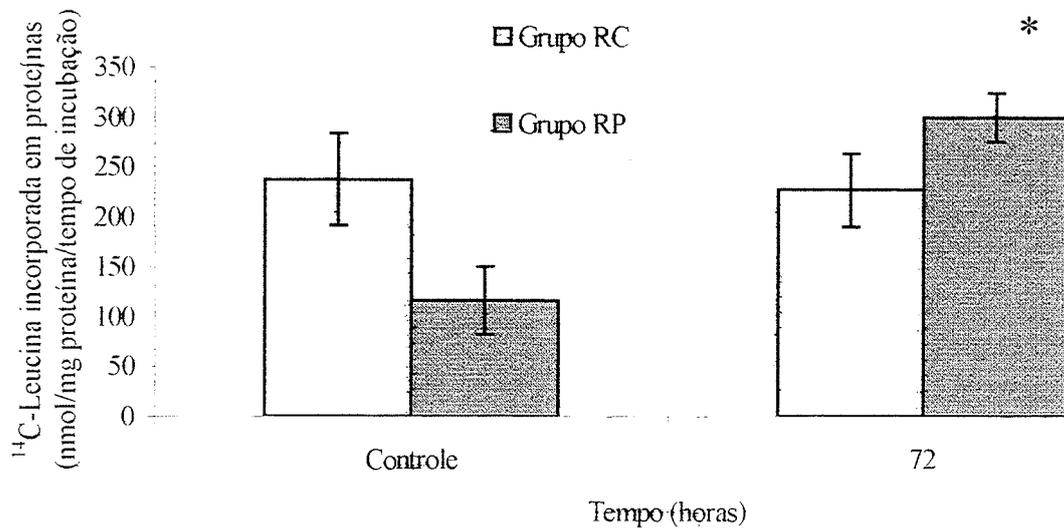


Figura 21. Síntese de ^{14}C -proteína a partir de L-leucina- $U\text{-}^{14}\text{C}$ pelas brânquias posteriores de *Chasmagnathus granulata* alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RC) e submetidos a 72 horas de estresse hiperosmótico. As colunas e as barras verticais representam, respectivamente, as médias \pm EPM de 4-5 animais. O asterisco representa a diferença significativa em relação ao controle.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstra que a composição da dieta administrada determina um padrão diferencial de resposta do metabolismo de carboidratos e de proteínas à diferentes tempos de estresse hiperosmótico em *Chasmagnathus granulata*. Apesar da diferença no padrão de resposta metabólica ao estresse entre as duas dietas, o processo adaptativo à alta salinidade obteve índice de 100% de sobrevivência em ambos os grupos nos tempos experimentais estudados.

A importância da composição da dieta sobre a regulação das reservas de carboidratos no caranguejo *C. granulata*, já havia sido demonstrada por Kucharski e Da Silva (1991a). Os resultados aqui apresentados estão de acordo com aqueles encontrados por esses autores que constataram, no grupo de animais alimentados com a dieta RC, um aumento significativo dos valores de glicose na hemolinfa, das reservas de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo quando comparados aqueles dos animais mantidos com a dieta RP.

Uma vez que a glicose é o principal substrato energético em crustáceos, sendo a principal hexose na hemolinfa desses animais (Herreid e Full, 1988; Morris e Airriess, 1998), alterações nos seus níveis circulantes são esperadas durante processos reguladores, como o de osmorregulação. Entretanto, no presente estudo não foram verificadas alterações dos níveis

hemolinfáticos de glicose nos animais adaptados à dieta RP nos períodos de estresse hipersalino estudados. Contudo, nos animais submetidos à dieta RC os valores de glicose na hemolinfa aumentam significativamente após cinco dias de estresse osmótico (Fig. 3).

De acordo com Santos e Nery (1987) em *C. granulata*, tanto no estresse hiposmótico de 0^o/_{oo} como no estresse hiperosmótico de 40^o/_{oo}, ocorre uma hipoglicemia no período de 72 horas. Já Da Silva e Kucharski (1992), verificaram que o estresse hiposmótico reduziu à valores nulos a concentração de glicose na hemolinfa somente em animais alimentados com a dieta RP e submetidos a três dias de choque hiposmótico. No presente estudo, a manutenção dos níveis de glicose hemolinfática durante o choque hiperosmótico, nos animais aclimatados à dieta RC ou RP, parece indicar que a hexose circulante não seria utilizada durante a regulação osmótica. Os tecidos estudados, o músculo, as brânquias e o hepatopâncreas demonstram capacidade *per se* de produzirem glicose pela via gliconeogênica, provavelmente, a partir de aminoácidos. Em *C. granulata* essa via metabólica foi recentemente comprovada no hepatopâncreas, sendo que a composição da dieta não determina uma resposta diferencial da sua atividade (Oliveira e Da Silva, 1997). Outro fator importante que provavelmente contribuiu para a estabilidade dos níveis de glicose hemolinfáticos durante o estresse hipersalino, foi a manutenção do comportamento alimentar durante os períodos de choque hiperosmótico, o que talvez seja o fator determinante que diferencia os resultados obtidos no presente trabalho daqueles constatados por Santos e Nery (1987). Os

autores mantiveram os animais em jejum durante todo o período experimental de estresse.

O tecido hepatopancreático do caranguejo *C. granulata* apresenta uma elevada concentração de glicogênio. Os dados da literatura demonstram que esse tecido funcionaria como um sítio de liberação de glicose durante situações desfavoráveis, como a restrição alimentar, a anoxia e o estresse hiposmótico (Da Silva e Kucharski, 1992; Nery e Santos, 1993; Vinagre e Da Silva, 1993; Oliveira, 1998).

Os resultados do presente estudo sobre o metabolismo de carboidratos no tecido hepatopancreático, demonstram que as dietas não determinam diferenças significativas nas concentrações de glicose livre e na capacidade de captação de glicose por esse tecido (Figs. 4 e 6). Entretanto, a administração da dieta RC elevou significativamente a concentração de glicogênio no tecido hepatopancreático, quando comparada àquela do grupo RP (Fig. 5). Verifica-se que a composição da dieta administrada aos caranguejos foi determinante para a resposta diferencial do padrão metabólico do tecido hepatopancreático durante os períodos de estresse estudados.

Nos animais adaptados à dieta RC, houve um aumento da captação de glicose pelo tecido hepatopancreático aos três dias de choque osmótico (Fig. 6). Provavelmente, a glicose foi utilizada pelo tecido como substrato energético para os processos osmorregulatórios durante os primeiros dias de choque osmótico. Entretanto, aos cinco dias de estresse osmótico, é possível

que os aminoácidos captados pelo hepatopâncreas, principalmente a glicina, tenham sido utilizados pela via gliconeogênica, levando ao aumento dos valores de glicose constatados na hemolinfa dos caranguejos mantidos com a dieta RC às 144 horas de experimento (Fig. 3).

A capacidade dos animais alimentados com a dieta RP de aumentarem em cerca de 40% os níveis de glicose livre às 72 horas de choque osmótico, parece estar relacionada com a via gliconeogênica desse tecido (Fig. 4). Oliveira e Da Silva (1999) demonstraram que o hepatopâncreas de *C. granulata* alimentado com a dieta RP aumenta significativamente a síntese de glicose a partir de ^{14}C -alanina e a atividade da PEPCK às 72 horas de choque hiposmótico.

Do ponto de vista bioecológico, a alta capacidade de sintetizar glicose, independente da dieta disponível, seria uma vantagem adaptativa para os organismos estuarinos, uma vez que esse habitat oferece uma grande variedade de itens alimentares, bem como amplas flutuações de fatores abióticos, como a salinidade, a temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido na água.

Essas alterações ambientais exigem a mobilização de reservas energéticas, as quais são consumidas durante os reajustes homeostáticos compensatórios (Pillet et al., 1995). Contudo, são necessários estudos mais aprofundados para o melhor entendimento do papel da via gliconeogênica no caranguejo *C. granulata* submetidos ao estresse hiperosmótico.

A comparação entre as respostas do metabolismo de carboidratos no tecido hepatopancreático de *C. granulata* submetido ao estresse hiperosmótico com aquelas obtidas por Da Silva e Kucharski (1992) durante o choque hiposmótico, utilizando o mesmo protocolo experimental, demonstra um padrão metabólico bastante diverso. O estresse hiposmótico promove o aumento das concentração de glicogênio hepatopancreático nos animais adaptados à dieta RP, sem contudo, alterar a concentração de glicogênio muscular. O presente estudo mostra que os níveis de glicogênio no hepatopâncreas dos animais aclimatados à dieta RP diminuem 60% no período inicial do estresse hiperosmótico, apontando para a predominância da via glicogenolítica nesse período (Fig. 5). Já no quinto dia de estresse hipersalino, o tecido hepatopancreático parece restabelecer seus níveis de glicogênio, não importando a salinidade do meio no qual o animal se encontra, demonstrando uma capacidade adaptativa do tecido ao choque osmótico. Entretanto, o tecido hepatopancreático dos caranguejo que foram adaptados à dieta RC, responde ao estresse hiposmótico com reduções dos níveis de glicogênio a partir das 24 horas, que se mantêm baixos até às 144 horas de choque hiposmótico (Da Silva e Kucharski, 1992). Ao longo dos períodos estudados, o estresse hiperosmótico não alterou significativamente as reservas de glicogênio no hepatopâncreas do grupo RC (Fig. 5).

Oliveira (1998) estudando o efeito da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no caranguejo *C. granulata*, comprovou a atividade do sistema enzimático glicogênio sintase e glicogênio fosforilase no hepatopâncreas de *C. granulata* adaptados às dietas RC e RP, sendo que em ambos os grupos

experimentais as enzimas têm atividades semelhantes. Assim, com o intuito de confirmar os dados obtidos no presente trabalho, sobre o efeito do estresse hiperosmótico no metabolismo de carboidratos no hepatopâncreas, serão necessários estudos futuros sobre a atividade dos sistemas enzimáticos glicogênio sintase e glicogênio fosforilase, comprovadamente envolvidos nas vias de síntese e degradação do glicogênio em tecidos de crustáceos (Seldmeir, 1982; Oliveira, 1998).

Nos caranguejos *C. granulata* alimentados previamente com a dieta RC, foi no tecido muscular que houve o maior acúmulo de glicogênio durante o estresse (Fig. 8). O aumento da concentração de glicogênio muscular às 24 horas de estresse hiperosmótico, sugere que nesse período a via gliconeogênica seria ativada, possivelmente, pelo aumento de captação de aminoácidos pelo tecido. Em outros crustáceos já foi demonstrado o potencial gliconeogênico do tecido muscular (Henry et al., 1994). Estudos futuros sobre a captação de aminoácidos e a via gliconeogênica nesse tecido serão necessários. A partir das 72 horas de estresse as reservas de glicogênio seriam utilizadas no processo adaptativo ao estresse. Concomitantemente à diminuição do glicogênio muscular às 72 e 144 horas, verifica-se um aumento de aproximadamente 30% da concentração de glicose livre no músculo no terceiro e no quinto dia de estresse osmótico (Fig. 7). O estresse hiperosmótico não altera a capacidade de captar glicose no tecido muscular do grupo RC (Fig. 9). Tais achados indicam que em um segundo momento, o aumento da salinidade levaria a ativação da via glicogenolítica e, talvez, da

via glicolítica, que parece ser a principal rota catabólica da glicose no músculo de crustáceos (Chang e O'Connor, 1983).

Quando se analisa o perfil de resposta do metabolismo de carboidratos no tecido muscular do grupo tratado com a dieta RP, constata-se que o estresse hiperosmótico não altera as reservas de glicogênio, de glicose livre ou captação de glicose ao longo dos diferentes períodos de estresse hiperosmótico estudados (Figs. 7, 8 e 9). Esses dados demonstram que no grupo RP, o tecido muscular é capaz de se adaptar ao estresse hiperosmótico, sem que haja alteração nas taxas de síntese/mobilização das suas reservas de carboidratos. Esta resposta foi semelhante a encontrada por Da Silva e Kucharski (1992) em *C. granulata* adaptado à dieta RP e submetido ao estresse hiposmótico pelos mesmos períodos de tempos deste estudo.

Santos e Nery (1993), estudando o efeito do estresse hiperosmótico de 40‰, na mesma espécie de caranguejo, constataram diferenças no perfil do metabolismo de carboidratos musculares durante o inverno e verão. Os autores constataram que o estresse hipersalino durante três e seis dias no verão, aumentava significativamente as concentrações de glicose e de glicogênio no tecido muscular. Entretanto, no inverno, o estresse hiperosmótico, ao longo de três dias, não foi capaz de alterar as reservas de carboidratos no tecido muscular. Deve-se levar em consideração, que nesse estudo os animais foram previamente alimentados com uma dieta de proteínas e mantidos em jejum durante o choque osmótico.

De acordo com Kucharski e Da Silva (1991b), as reservas de lipídios musculares do caranguejo *C. granulata* seriam consumidas preferencialmente no verão, enquanto que as reservas de carboidratos utilizadas como fonte principal de energia nos meses de inverno.

No presente estudo, não foi considerado o parâmetro sazonalidade, contudo, não podemos descartar a hipótese de que o tecido muscular dos animais adaptados à dieta rica em proteínas e submetidos ao choque hiperosmótico, tenha utilizado os lipídios como fonte energética. Hohnke e Scheer (1970), em sua revisão sobre o metabolismo de carboidratos em crustáceos, sugerem o conceito da “personalidade tecidual”, na qual cada tecido é caracterizado pelo uso preferencial de distintos substratos como fonte energética.

Conforme Bromberg (1992), o caranguejo *C. granulata* pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, uma vez que suporta uma ampla variação de salinidade, sendo capaz de hiperregular de 0‰ a 20‰ e hiporregular em 40‰. O ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e verão, respectivamente. A autora destacou o processo de regulação isosmótica intracelular como parte dos mecanismos envolvidos na adaptação desse caranguejo a meios com diferentes salinidades, visto que sua concentração hemolinfática de íons sofreu consideráveis alterações após os choques osmóticos.

Durante as adaptações ao estresse osmótico, provavelmente, o tecido branquial é o que mais consome energia, uma vez que ele deve assegurar a

regulação isosmótica do fluido intracelular como também a regulação anisosmótica do fluido extracelular. Segundo Gilles (1982) os crustáceos eurialinos apresentam esses dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico, onde a regulação anisosmótica do fluido extracelular tem por objetivo controlar a osmolaridade da hemolinfa independentemente da osmolaridade do meio externo; e a regulação isosmótica do fluido intracelular tem o intuito de mantê-lo isosmótico em relação ao extracelular.

Estudos sobre as respostas fisiológicas do tecido branquial em crustáceos eurialinos, têm apontado para alterações da taxa metabólica durante as adaptações ao estresse osmótico. Essas respostas estão relacionadas à alterações no consumo de oxigênio, proliferação das células de cloreto ricas em mitocôndrias, nas atividades das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica, na taxa de oxidação de aminoácidos, assim como mudanças quantitativas nos fosfolípidios de membrana e no conteúdo de ATP do tecido (Copeland e Fizarrell, 1968; Whitney, 1974, Engel et al., 1975; Pierce, 1982; Gilles, 1983; Péqueux e Gilles, 1988; Henry, 1988 a, b).

Está descrito na literatura que o tecido branquial apresenta uma diferenciação funcional e estrutural. As brânquias anteriores apresentam um epitélio do tipo respiratório e não apresentam alterações significativas na sua estrutura pela variação de salinidade do meio. Já nas brânquias posteriores, a atividade osmorregulatória é predominante, e dependendo da salinidade do meio no qual se encontra, o processo de transporte de cloreto de sódio pode ser ativado ou desativado. Também, ocorrem modificações na ultraestrutura

do epitélio de transporte, com alterações nas vilosidades da membrana apical e no número de mitocôndrias, indicando alterações no metabolismo oxidativo, no consumo de oxigênio e na produção de dióxido de carbono (Gilles e Péqueux, 1985; Péqueux e Gilles, 1988).

Os dados obtidos no presente estudo sobre o metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores de *C. granulata*, sugerem que a composição da dieta é capaz de promover um ajuste metabólico diferencial no tecido branquial nos períodos de estresse hiperosmótico estudados. Embora, os valores iniciais das concentrações de glicogênio, de glicose livre e de captação de glicose nesse tecido não tenham sido significativamente diferentes.

As brânquias anteriores e posteriores dos animais do grupo RC não apresentaram alterações significativas em suas reservas de carboidratos e nem na captação de glicose ao longo do estresse hiperosmótico (Figs. 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Já as brânquias anteriores e posteriores dos caranguejos do grupo RP, mostram um aumento de aproximadamente 50% dos níveis de glicose livre às 24 horas de choque hiperosmótico (Figs. 10 e 12), acumulando, no terceiro dia de experimento, glicogênio em concentrações aproximadamente 60% mais elevadas que àquelas do grupo controle (Figs. 11 e 13).

Thrabrew et al., (1971) comprovaram a existência da via gliconeogênica em brânquias isoladas de *Carcinus maenas*. Em nosso laboratório, estudos prévios (dados não publicados) têm demonstrado que as

brânquias de *C. granulata* possuem uma alta capacidade de sintetizar glicose a partir de ^{14}C - alanina.

Os resultados obtidos no presente trabalho (aumento da concentração de glicose livre e de glicogênio) sugerem a ativação da via gliconeogênica durante o estresse hiperosmótico, nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *C. granulata* adaptados à dieta rica em proteínas. Não foi constatado aumento significativo da captação de glicose às 72 horas de choque osmótico, o que corrobora para a hipótese de síntese de glicose, provavelmente, a partir de aminoácidos. A explicação mais viável para esta conclusão, indica que a dieta RP forneceria quantidades elevadas de aminoácidos, assim, parte destes compostos quando capturados pelo tecido branquial durante o choque hiperosmótico, seriam utilizados pela via gliconeogênica, fornecendo glicose como fonte energética para o processo de osmorregulação.

Os principais efetores orgânicos osmoticamente ativos em crustáceos são os aminoácidos livres tissulares, destacando-se a arginina, a alanina, a glicina, a prolina, o ácido glutâmico e a taurina. Os aminoácidos livres contribuem com aproximadamente 50% da pressão osmótica intracelular (Gilles, 1982; Robertson, 1992; Bishop e Burton, 1993)

Diversos estudos em invertebrados têm demonstrado que durante o estresse hiperosmótico, a concentração de aminoácidos tissulares aumenta (Okuma e Abe, 1994; Matsushima e Hayashi, 1992; Bishop et al., 1994; Baginske e Pierce, 1977; Bishop e Burton, 1993; Kasschau, 1984;

Dragolovich e Pierce, 1992), contudo, poucos são os estudos que levam em consideração a composição da dieta sobre a concentração de aminoácidos livres hemolinfáticos e teciduais e a síntese de proteínas em tecidos de crustáceos (Houlihan et al., 1990; Houlihan, 1991; Vinagre e Da Silva, 1993; Schein et al., 1997).

No camarão *Macrobrachium rosebergii*, Tan e Choong (1981), verificaram que o estresse hiperosmótico levava à redução significativa da concentração de proteínas hemolinfáticas. Essa diminuição era acompanhada pelo concomitante aumento dos aminoácidos livres musculares, principalmente, a prolina, o ácido glutâmico, a glicina, a alanina e a arginina, indicando o envolvimento desses aminoácidos no reajuste osmótico.

Estudos com crustáceos decápodes demonstraram que as proteínas hemolinfáticas e tissulares seriam uma fonte de aminoácidos livres durante o estresse osmótico, visto que as concentrações de proteínas na hemolinfa e no tecido hepatopancreático, assim como os níveis de aminoácidos livres hemolinfáticos, diminuíram durante o choque hiperosmótico (Koenig, 1981; Tan e Choong, 1981; Tan e Choong, 1981; Freire et al., 1995). Já no camarão *M. rosebergii*, foi verificado um aumento de 300% nos efetores orgânicos musculares durante o choque hiperosmótico, sendo que a prolina aumentou cerca de 2 a 5 vezes (Tan e Choong, 1981). Assim, parece que a degradação das proteínas teciduais tem como objetivo fornecer aminoácidos

osmoticamente ativos para que os tecidos possam responder eficientemente ao estresse osmótico.

A quantificação de aminoácidos livres na hemolinfa de caranguejo *C. granulata* demonstrou que em animais adaptados à salinidade de 20‰ e alimentados com a dieta RC ou RP, os aminoácidos que apresentaram as maiores concentrações foram a glicina, a serina, a arginina, a alanina e a prolina (Fig. 16 e 17). Na determinação dos aminoácidos livres hemolinfáticos no caranguejo *C. granulata*, não foi feita distinção entre as forma D e L-aminoácidos, embora a forma D-aminoácidos exerça um importante papel nos processos de osmorregulação em invertebrados aquáticos (Preston, 1987; Okuma e Abe, 1994).

Em ambas as dietas experimentais, as concentrações micromolares dos diferentes aminoácidos foram similares. Este dado comprova que a composição da dieta não tem influência sobre os níveis basais da glicina, da serina, da arginina, da alanina e da prolina (Figs. 16 e 17). Porém, quando os animais foram submetidos ao choque hiperosmótico, a composição hemolinfática dos animais tratados com a dieta RC apresenta perfil distinto daquela dos caranguejos adaptados à dieta RP. Nas primeiras 24 horas de estresse hiperosmótico, a concentração de glicina diminuiu 62% e os níveis de serina e de arginina reduziram em aproximadamente 36% e 70%, respectivamente, mantendo-se baixos até o final do período experimental. Esses resultados demonstram que os ajustes osmóticos à alta salinidade nos caranguejos adaptados à dieta RC, envolvem mudanças marcantes dos

níveis hemolinfáticos de aminoácidos livres. A glicina, a serina e a arginina parecem ser os efetores orgânicos mais importantes para a resposta osmorregulatória em *C. granulata* adaptado à dieta rica em carboidratos.

Por outro lado, os animais que foram adaptados à dieta RP, apresentaram níveis reduzidos somente do aminoácido glicina, aproximadamente 30% e 40% às 24 e 72 horas de choque hiperosmótico. Já os aminoácidos arginina, alanina e prolina tendem a aumentarem suas concentrações hemolinfáticas às 72 horas, em cerca de 35%, 50% e 62%, respectivamente. O choque hiperosmótico não determinou mudanças nas concentrações de serina ao longo do tempo. Esses resultados sugerem que no grupo RP submetido ao estresse hiperosmótico, o aporte de aminoácidos através da dieta aumentou a concentração intracelular de compostos nitrogenados, possibilitando aos caranguejos a manutenção dos níveis de aminoácidos hemolinfáticos ao longo do estresse hipersalino.

Devemos destacar o possível papel de fatores neuroendócrino que atuam sobre os níveis hemolinfáticos dos efetores orgânicos e/ou inorgânicos, durante as adaptações ao estresse osmótico (Mantel, 1985; Muramoto, 1988; McNamara et al., 1990; Kamemoto, 1991; Eckhardt et al., 1995). Trabalhos realizados, tanto *in vitro* em brânquias isoladas como *in vivo* em animais íntegros, indicam o envolvimento do pedúnculo ocular no processo de regulação osmótica em crustáceos.

Freire et al. (1995), estudando o controle neuroendócrino da regulação osmótica no camarão *Macrobrachium olfersii*, demonstraram que a injeção

intramuscular de um homogeneizado obtido a partir do pedúnculo ocular, levou ao aumento da concentração dos aminoácidos livres hemolinfáticos durante o choque hiposmótico. Nos animais submetidos ao choque hiperosmótico, o homogenado obtido do gânglio torácico foi mais efetivo em promover aumento dos níveis de aminoácidos livres hemolinfáticos. Já estudos com o caranguejo *Pachygrapsus marmoratus* (Eckhardt et al., 1995) demonstraram a presença de um peptídeo presente na glândula do seio desse crustáceo, com características estruturais semelhante àquelas dos membros da família CHH/MIH/VIH. Esse fator neuroendócrino estaria envolvido com a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e com o influxo de Na^+ através da epitélio das brânquias posteriores durante as adaptação fisiológicas à alterações de salinidade. Visando um melhor entendimento sobre o controle dos processos metabólicos envolvidos na osmorregulação em *C. granulata*, estudos futuros envolvendo fatores neuroendócrinos serão necessários.

Lyndon e Houlihan (1998), em sua revisão sobre o "turnover" de proteínas em brânquias de peixes e crustáceos, demonstraram que o tecido branquial é o tecido mais ativo em termos de síntese de proteínas, seguido pelo fígado e hepatopâncreas, músculo e coração. Esses dados são concordantes com os encontrados no presente trabalho, onde os valores para a síntese de proteínas no tecido branquial são 100 vezes maiores que aqueles obtidos no hepatopâncreas e no músculo (Figs. 18, 19, 20 e 21).

O tecido branquial apresenta uma grande área de superfície exposta ao meio ambiente, devido a função respiratória e osmorregulatória. Postula-

se que a síntese de proteínas nas brânquias seja conservada mesmo em períodos de condições adversas de temperatura, salinidade ou restrição alimentar, o que é justificável pelo papel central desse tecido na sobrevivência do animal. Na literatura consultada, não foram encontrados dados do efeito de mudanças de salinidade sobre a síntese de proteínas em brânquias de invertebrados. Contudo, em *Tilapia mossambicus* foi demonstrado que o aumento abrupto da salinidade leva ao aumento da síntese proteica mitocondrial, que foi atribuída ao aumento da atividade das células de cloreto (Suresh et al., 1983).

Vinagre (1992), estudando o metabolismo de proteínas no caranguejo *C. granulata*, demonstrou que as dietas rica em carboidratos ou proteínas não determinam diferenças significativas na concentração de proteínas totais nos tecidos hepatopancreático, muscular e branquial.

No entanto, quando analisado o efeito do estresse hiperosmótico sobre a síntese de proteínas, verifica-se que nos animais mantidos com a dieta RP ocorreu um aumento na incorporação de ^{14}C -leucina em proteínas no tecido hepatopancreático, muscular e branquial posterior (Fig. 18, 19 e 21). Os tecidos hepatopancreático e muscular dos animais adaptados à dieta RP, aumentaram em cerca de 44% sua capacidade de síntese de proteínas. Já nas brânquias posteriores esse aumento foi de cerca de 61%.

Lyndon e Houlihan (1998) sugerem um elevado grau de plasticidade do metabolismo protéico mesmo em condições adversas, o que assegura a manutenção da integridade das funções branquiais.

No grupo RC, o estresse hiperosmótico de três dias não altera significativamente a capacidade de síntese protéica no músculo, nas brânquias anteriores e posteriores do caranguejo *C. granulata* (Figs. 19, 20 e 21). Entretanto, o tecido hepatopancreático apresentou um aumento de 45% da capacidade de síntese de proteínas (Fig. 18).

Os resultados aqui apresentados permitem sugerir que o tecido hepatopancreático atue como um importante sítio de produção de compostos nitrogenados, independentemente da composição da dieta, durante o estresse hiperosmótico, como foi verificados para outras espécies de crustáceos (Tan e Choong, 1981; Koenig, 1981). Contudo, estudos mais detalhados sobre o “turnover” de proteínas e sobre a captação, a síntese/degradação de aminoácidos no hepatopâncreas, serão necessários para a comprovação dessa hipótese. Também, a determinação da concentração de aminoácidos livres nos tecidos do caranguejo *C. granulata* submetidos à dieta RC ou RP e ao choque hiperosmótico, serão relevantes na medida em que poderão fornecer informações sobre as concentrações dos principais aminoácidos envolvidos com os processos osmorregulatórios teciduais, bem como daqueles envolvidos preferencialmente na síntese protéica.

Concluindo, os resultados obtidos no presente trabalho permitem sugerir que a composição das dietas administradas ao caranguejo *C. granulata* diferencia o padrão de resposta do metabolismo de carboidratos e

proteínas, bem como a concentração dos aminoácidos hemolinfáticos, durante os períodos de estresse hiperosmótico estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez, J.A. (1978). Una observación en el estuario de Tramandaí, RS. **Pesquisas**, **12**: 189-208.
- Baginske R. M; Pierce, S. K. Jr. (1977). The time course of intracellular free amino acid accumulation in tissue of *Modiolus demissus* during high salinity adaptation. **Comp. biochem. Physiol.**, **57 A**: 407-412.
- Barabarash, G.R.; Quarles, R.H. (1982). Single-column amino-acid-analysis with ortho-phthalaldehyde- an evaluation of 2 commercial buffer systems. **Anal. Biochem.**, **119**: 177-184.
- Bishop, S.H.; Burton, R.S. (1993). Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, **106 A** (1): 49-56.
- Bishop, S.H.; Greenwalt, D. E.; Martin, A.K., Paynter, K.T.; Ellis, L.L. (1994). Metabolic regulation os proline, glycine and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. **J. Exp. Zool.**, **268**: 151-161.
- Boschi, E.E. (1964). Los crustaceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. **Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)**, **6**: 1-76.
- Bowlos, R.D; Somero, G.N. (1979). Solute compatibility with enzyme function and structure: rationales for the section of osmotic agents and end-products of anaerobic metabolism in marine invertebrates. **J. Exp. Zool.** **208**: 137-152.
- Bricteux-Grégoire, S.; Duchâteau-Bosson, G.; Jeuniaux, C. and Florkin, M. (1962). Les constituants osmotiquement actifs des muscles et leur

- contribution à la régulation isosmotique intracellulaire chez *Limulus polyphemus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **19**: 729-736.
- Bromberg, E (1992). **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão.** Rio Grande: FURG, 1992. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica)- Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Carr, R.S.; Neff, J.M. (1984). Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. **Comp. Biochem. Physiol.**, **77 B** (3): 447-449.
- Chang, E.; O'Connors, J.D. (1983). Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss, D.E. (ed), **The Biology of Crustacea.** Academic Press, New York. p. 263-289.
- Chuang, N-N.; Wang, P-C. (1994). Characterization of insulin receptor from the muscle of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.**, **108**: 289-297.
- Cooper, A.W. (1974). Salt Marshes. In: Odum, H.T.; Copeland, B.J. and Macmahon, E.A. (eds), **Coastal Ecological Systems of United States.** The Conservation Foundation, Washinton D.C. V.II, p.55-98.
- Copeland, D.E.; Fitzjarrel, A.T. (1968). The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. **Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.**, **92**: 1-22.
- Da Silva, R.S.M.; Kucharski, L.C.R. (1992). Effect of Hyposmotic Stress on the Carbohydrate Metabolism of Crabs Maintained on High Protein or Carbohydrate-Rich Diet. **Comp. Biochem. Physiol.** **101 A** (3): 631-634.

- D'Incao, F.; Ruffino, M.L.; Silva, K.G.; Braga, A.C. (1990). Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra de Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Atlântida**, **12** (2): 85-93.
- Drach, F.; Tchernigovtzeff, C. (1967). Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu**, **161**: 595-607.
- Dragolovich, J. e Pierce, S. K. (1992). Comparative time courses of inorganic and organic osmolyte accumulation as horseshoe crabs (*Limulus polyphenus*) adapt to high salinity. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102 A** (1): 79-84.
- Duchateau, G.; Florkin, M; Jeuniaux, C. (1959). Compesante amino-acide des muscles de *Carcinus maenas* L. lors du passade de l'leuau saumatre et au cours de la meu. **Archs. Int. Physiol. Biochem.** **67**:489-500.
- Eckhardt, E.; Pierrot, C.; Thuet, P.; Van Herp, F.; Daures, C. M.; Trilles, J.P; Charmantier, G. (1995). Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Poligrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **99**: 169-177.
- Ellington, W.R. (1983). The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates. **J. Exp. Zool.**, **228**: 431-444.
- Engel, D.W.; Ferguson, R.L.; Eggert, L.D. (1975). Respiration rates and ATP concentrations in the excised gills of the blue crab as a function of salinity. **Comp. Biochem. Physiol.**, **52 A**: 669-673.
- Freire, C.A; McNamara, J.C.; Rosa, J.C. (1995). Neuroendocrine control of osmotic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda)- Free-amino-acid concentrations in the hemolymph. **Gen. Comp. Endocr.** **100** (1): 83-91.

- Geary, N.; Langhans, W.; Scharrer, E. (1981). Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. **Am. J. Physiol.**, **241**(10): R330-R335.
- Gilles, R. (1977). Effects of osmotic stresses on the proteins concentration and pattern of *Eiriocheir sinensis* blood. **Comp. Biochem. Physiol.** **56A**: 109-114.
- Gilles, R. (1982). Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, **6**:1-36.
- Gilles, R. (1983). Review: Volume maintenance and regulation in animal cells: some features and trends. **Molec. Physiol.**, **4**: 3-16.
- Gilles, R. (1987). Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. **Curr. Topics Membrane Transp.**, **30**: 205-247.
- Gilles, R.; Pequeux, A. (1985). Ion transport in crustacean gills: Physiological and ultrastructural approaches. In : Gilles, R.; Gilles-Baillien, M. (ed) **Transport Process, Ions and Osmoregulation**. Current Comparative Approaches, Springer-Verlag, Berlin. p. 136-158.
- Gilles, R. (1997). "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** **117A**: 279-290.
- Gilles, R.; Delpire, E. (1997). Variations in salinity, osmolarity, and water availability: Vertebrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed). Handbook of comparative physiology. Oxford University Press, New York, Oxford, p. 1523-1586.
- Henry, R.P. (1988a). The subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crab. *Callinectes sapidus*. **J. Exp. Zool.**, **245**: 1-8.

- Henry, R.P. (1988b). Multiple functions of crustacean gill carbonic anhydrase. **J. Exp. Zool.**, **248**: 19-24.
- Henry, R.P.; Booth, C.E. Lallier, F.H.; Walsh, P.J. (1994). Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. **J. Exp. Biol.** **186**: 215-234.
- Herreid, C.F.; Full, R.J. (1988). Energetics and locomotion. In: Macmahon, B. (ed), **Biology of Land Crabs**. Cambridge University Press, Cambridge. p.337-377.
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N.; Schneider, D.E.; Freed, J.M. (1970). The organization and control of metabolism in the crustacean gill. **Comp. Biochem. Physiol.**, **33**: 529-548.
- Hohnke, L.; Scherr, B.T. (1970). Carbohydrate metabolism in crustaceans. In: Forkin, M. e Scheer, BT (Ed), **Chemical Zoology** Academic Press, New York. v. 1:147-166.
- Houlihan, D.F. (1991). Protein turnover in ectotherms and its relationships to energetics. **Adv. Comp. Env. Physiol.**, **7**: 1-44.
- Houlihan, D.F; Waring, P.C.; Mathers, E.; Gray, C. (1990). Protein synthesis and oxigen consumption of the shore crab *Carcinus maenas* after meal. **Physiol. Zool.**, **63**: 735-756.
- Huggins, A.K e Munday, K.A. (1968) Crustacean metabolism. **Adv. Comp. Physiol. Biochem.**, **3**: 271-376.
- Johnston, M.A.; Davies, P.S. (1972). Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **41 B**: 433-443.
- Kamemoto, F. I. (1991). Neuroendocrinology of osmorregulation in crabs. **Zool. Sci.** **8**: 827-833.

- Kasschau, M. R.; Skisak, C. M.; Cook, J. P. e Mills, W. R. (1984). β -Alanine metabolism and high salinity stress in the sea anemone, *Bunodosoma cavernata*. **J. Comp. Physiol.**, **154 B**: 181-186.
- Kegel, G.; Reichwein, B.; Weese, S.; Gaus, G.; Katalinic, J.P.; Keller, R. (1989). Aminoacid sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. **FEBS Lett.**, **255**: 10-14.
- Keller, R. (1992). Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. **Experientia**, **48**: 439-448.
- Keller, R.; Orth, H.P. (1990). Hyperglycemic neuropeptides in crustaceans. In: Epple, A.; Scanes, C.G.; Stetson, M.H. (ed), **Progress in Comparative Endocrinology**. Wiley-Liss, New York, p.265-271.
- Koenig, M.L. (1981). Aspects of glycine metabolism in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*) acutely exposed to hypersaline conditions. M.S.Thesis, Texas A&M University.
- Kucharski, L.C.; Silva, R.S.M. (1992). Effects of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, **101**: 631-634.
- Kucharski, L.C.R (1997). **Insulina: presença de receptores e efeito biológico em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Porto Alegre: UFRGS, 1997. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Kucharski, L.C.R. (1990). **Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Porto Alegre: UFRGS, 1990. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Kucharski, L.C.R.; Capp, E.; Chittó, A.L.; Trapp, M.; Da Silva, R.S.M.; Marques, M. (1999). Insulin signaling: tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. **J. Exp. Zool.**, **283** (1): 91-94.
- 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.**, **99**(1/2):215-218.
- Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. (1991a). Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, **100 A** (3): 599-602.
- Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. (1991b). Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, **99A**: 215-218.
- Kucharski, L.C.R.; Ribeiro, M.F.; Schein, V.; Da Silva, R.S.M.; Marques, M. (1997). Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **J. Exp. Zool.**, **279**: 118-125.
- Kummer, G. e Keller, R. (1993). High-affinity binding of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) to hepatopancreatic plasma membranes of the crab *Carcinus maenas* and the crayfish *Orconectes limosus*. **Peptides**, **14**: 103-108.
- Lin, C.L; Wang, P.C.; Chuang, N. N. (1993). Specific phosphorylation of membrane proteins of Mr44,000 and Mr 32,000 by the autophosphorylated insulin receptor from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). **J. Exp. Biol.**, **267** (2): 113-119.

- Lira, L.; Martins, I.; Araújo, T.H.; e Dehnhard, E.A. (1976). Nota prévia sobre o comportamento da cunha salina no estuário de Tramandaí (RS). In: Anais da UFRPE, Ciências Biológicas, Recife. v.3, n. 1, p. 115-126.
- Longenecker, J.B.; Hause, N.L. (1959). Relationships between plasma amino acids and composition of the ingested protein. **Arch. Biochem. Biophys.** **84**: 46-59.
- Loret, S.M.; Devos, P.E. (1992). Structure and possible functions of the calcospherite-rich cells (R-cells) in the digestive gland of the shore crab *Carcinus maenas*. **Cell Tissue Res.**, **267**: 105-111.
- Loret, S.M.; Van Der Goor, N.; Devos, P.E. (1989). Susoensions d'hemocytes et d'hepatopancreatocytess pour létude *in vitro* de la charge en glucose chez um Crustacé Décapodé. **Oceanis**, **15**(4): 419-431.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Fau, A.L.; Randal, R.J. (1951). Protein menasurements with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, **183**: 265-275.
- Lyndon, A.R.; Houlihan, D.F. (1998). Gill protein turnover: costs of adaptation. **Comp. Biochem. Physiol.**, **119 A**(1): 27-34.
- Machado, V.L.M.; Da Silva, R.S.M.; Marques, M.; Wassermann, G.F. (1982). Insulin uptake and action on deoxiglicose transport in rat adrenal glands. **Med. Sci.**, **10**: 459-460.
- Mane-Garzon, F.; Dei-Cas, E.; Spector, B.H.; Leymonte, J. (1974). Estudios sobre la biologia del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. **Physis**, **Seccion A**, **33** (86): 163-171.
- Mantel, L.H. (1985). Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. **Am. Zool.** **25**: 253-263.

- Mantel, L.H.; Farmer, L.L. (1983). Osmotic and ionic regulation. In : Bliss, E.; Mantel, L.H. (ed), **The Biology of Crustacea**. v. 5, Academic Press, London. p. 53-161.
- McNamara, J.C.; Salomão, L.C.; Ribeiro, E.A. (1990). The effects of eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). **Hydrobiologia** **199**: 193-200.
- Matsushima, O.; Yamada, A. (1992). Uptake of L and D-alanine by a brackish-water bivalve, *Corbicula japonica*, with special reference to their transport pathways and the salinity effect. **J. Exp. Zool.** **263**: 8-17.
- Matsushima, O; Hayashi, Y.S. (1992). Metabolism of D e L-alanina and regulation of intracelular free amino acids levels during salinity stress in a bracksh-water bivalve *Corbicula japonica*. **Comp. Biochem. Physiol.** **102A**: 465-471.
- Meenakshi, V.R.; Scheer, B.T. (1961). Metabolism of glucose in the crabs *Cancer magister* and *Hemigrapsus nudus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **3**: 30-41.
- Miranda, R.B. (1994). **Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a ionorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851**. Rio Grande: FURG, Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica)- Instituto de Biociências, Fundação Universidade de Rio Grande.
- Moreno, J.A. (1961). **Clima do Rio Grande do Sul**. Publicação da Secretaria de Agricultura do Estado do RGS. Diretoria de terras e colonização, seção de geografia. Porto Alegre.
- Morris S.; Airriess, C.N. (1998). Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. **S. Afr. J. Zool.** **33**: 87-106.

- Muramoto, A. (1988). Endocrine control of water balance in decapod crustaceans. In: Laufer, H e Downer, R. (eds). Endocrinology os selected invertebrates types. Liss, New York, p. 341-356.
- Nery, L.E.M. (1990) **Efeito da salinidade no metabolismo de carboidratos de *Chasmagnathus granulata* DANA, 1851 (Crustácea - Decapoda).** Rio Grande: FURG, 1990. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade do Rio Grande.
- Nery, L.E.M; Santos, E.A. (1993) Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (crustacea, decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.**, **106 B** (3): 747-753.
- Odum, E.P. (1985). **Ecologia.** Interamericana (ed), Rio de Janeiro, 435p.
- Okuma, E. e Abe, H. (1994). Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. **Comp. Biochem. Physiol.**, **109 A** (1): 191-197.
- Okuma, E. e Abe, H. (1998). Effects of starvation and D- or L- alanine administration on the free D- and L- alanine levels in the muscle and hepatopancreas of the crayfish, *Procambarus clarkii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, **120 A**: 681-686.
- Oliveira, G.T. (1998). **Metabolismo de carboidratos em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos a diferentes períodos de anoxia ambiental e de recuperação.** Porto Alegre: UFRGS, 1998. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Oliveira, G.T. (1993). **Estudo *in vitro* da gliconeogênese no hepatopâncreas do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae).** Porto Alegre: UFRGS, 1993.

- Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Oliveira, G.T.; Da Silva, R.S.M. (1999). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **J. Comp. Physiol.**, (submetido).
- 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.**, **118 A** (4): 1429-1435.
- Péqueux, A. e Gilles, R. (1988). NaCl transport in gills and related structures In: Greger, R.J (ed), **Advances In Comparative and Environmental Physiology**. Vol.1 Springer-Verlag, Berlin., p. 2-47.
- Péqueux, A. e Gilles, R. (1988). The transepithelial potential difference of isolated perfused gill of the the chinese crab *Eriocheir sinensis* acclimated to freshwater. **Comp. Biochem. Physiol.**, **89**: 162-172.
- Péqueux, A.; Gilles, R. (1984). Control of the extracellular fluid osmolality in crustaceans. In: Péqueux, A.; Gilles, R.; Bolis, L. (ed), **Osmoregulation in estuarine and marine animals**. Proc 5th Conf. Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem., Taormina, Italy pp. 17-34. *Lecture Notes on Coastal and estuarine Studies*, vol. 9. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Pierce, S. K. (1982). Invertebrate cell volume control mechanisms: A coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute. **Biol. Bull. Mar. Biol. Bull.**, **Woods Hole**, **163**: 405-419.
- Pierce, S.K.Jr. (1971). A source of solute for volume regulation in marine mussels. **Comp. Biochem. Physiol.**, **38 A**: 619-635.

- Pillet, S.C, Henry, R.P., Doeller, J.E e Krauss, D.W. (1995). A comparison of the gill physiology of two euryaline crabs species, *Callinectes sapidus* e *Callinectes similis*: energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function as acclimation salinity. **J. Exp. Zool.**, **198**: 349-359.
- Pressley, T.A.; Graves, J.S. (1983). Increased amino acid oxidation in the gills of the blue crabs acclimated to dilute seawater. **J. exp. Zool.** **226**: 45-51.
- Preston, R.L. (1987). Ocurrence of D-amino acids in higher organisms: a survey of the distribution of D-amino acids in marine vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, **87 B**: 55-62.
- Prosser, C.L. (1958). General Summary: The nature of physiological adaptation. In: Prosser, C.L. (ed) Physiological adaptation. Amer Physiol. Soc., Washington: 167-180.
- Rathbum, M.J. (1918). The grapsoid crabs of America. **Smithsonian Institution, Bull. U. S. Nat. Mus.**, **97**: 97-445.
- Richardson, N.A.; Anderson, A.J.; Sara, V.R. (1997). The effects of insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). **Gen. Comp. Endocrinol.**, **105**: 287-293.
- Robertson, J.D.;Cowey, C.B.; Leaf, G. (1992). The free amino acids in muscle as three marine invertebrates *Nephrops norvegicus* (L), *Limulus polyphemus* (L) and *Eledone cirrhosa* (Lamarck). **Comp. Biochem. Physiol.**, **101 A** (3): 545-548.
- Robinson, G.D. (1994). Effects of acclimatacion salinity on sodium fluxes in the blue crab (*Callinectes sapidus*). **Comp. Biochem. Physiol.** **108A**:69-73.

- Sanders, B. (1983a) Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*.
I. Insulin immunoreactivity. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **50**: 366-373.
- Sanders, B. (1983a) Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*.
I. Insulin immunoreactivity. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **50**: 366-373.
- Sanders, B. (1983b). Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*
. II. Insulin-like biological activity. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **50**: 374-377.
- Sanders, B. (1983c). Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*
. III. No glucostatic role. **Gen. Comp. Endocrinol.**, **50**: 378-382.
- Santos, E.A.; Baldisseroto, B.; Bianchini, A.; Colares, E.P.; Nery, L.E.M. e
Manzoni, G.C. (1987). Respiratory mechanisms and metabolic adaptations
of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp.
Biochem. Physiol.**, **88A** (1): 21-25.
- Santos, E.A.; Keller, R. (1993a). Effect of exposure to atmospheric air on
blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role
of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). **Comp. Biochem.
Physiol.**, **106 A** (2): 343-347.
- Santos, E.A.; Keller, R. (1993b). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH)
and the regulation of carbohydrate metabolism: current perspectives.
Comp. Biochem. Physiol., **106 A** (3): 405-411.
- Santos, E.A.; Nery, L.E.M. (1987). Blood glucose regulation in an estuarine
crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different
salinities. **Comp. Biochem. Physiol.**, **87 A** (4): 1033-1035.
- Schein, V.; Kucharski, L.C.; Da Silva, R.S.M. (1997). Efeito do estresse
hiperosmótico sobre o metabolismo energético em *Chasmagnathus
Granulata*. In: **Congresso Latinoamericano De Ciências Fisiológicas**,
Caracas, Venezuela, p.88.

- Schimit, A. S.C; Santos, E. (1993). Behaviour and haemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda) During emersion. **Comp. Bioch. Physiol.** **106A** (2): 337-342.
- Schoffeniel, E. (1976). Adaptacions with respect to salinity. **Bioch. Soc. Sympo.** **41**: 179-204.
- Seldmeier, D. (1982). The mode of action of crustacean neurosecretory hyperglycemic hormone (CHH). II- Involvement of glycogen synthase. **General and Comparative Endocrinology**, **47**: 426- 432
- Seldmeier, D. (1987). The role of hepatopancreatic glycogen in the action of crustacean hyperglycemic hormone (CHH). **Comp. Biochem. Physiol.**, **87 A**: 423-425.
- Siebers, D. (1974). Mechanism of intracellular isosmotic regulation: fate of ¹⁴C-labelled serum proteins in the shore crab *Carcinus maenas* after changed salinity. **Hel-goländer wiss. Meeresunters**, **26**: 357-381.
- Spaargaren, D.H.(1995). A functional model for descring the responses to salinity stress in aquatic animal. **Comp. Biochem. Physiol.** **111A**(3):501-506.
- Stuart, J.S.; Hung, S.S.O. (1989). Growth of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fed different proteins. **Aquaculture**, **76**: 303-316.
- Surech, N.; Shivakumar, K.; Jayaraman, J. (1983). The adaptation to salinity: protein synthesis and some aspects of energy transduction in fish gill mitochondria. **J. Bioenerg. Biomemb.** **15**: 379-394.
- Tan, C. H. e Choong, K. Y. (1981). Effect of hyperosmotic stress on hemolymph protein, muscle nihydrin-positive substances and free amino

- acids in *Macrobrachium resenberdii* (De Man). **Comp. Biochem. Physiol.**, **70 A**: 485-489.
- Thrabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. (1971). Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, **40B**: 531-541.
- Turcato, G.S. (1990). **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Porto Alegre: UFRGS, 1990. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas-Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt. Biochem.**, **11**: 256-265.
- Vinagre, A.S. and Da Silva, R.S.M. (1992). Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, **102** (3): 579-583.
- Vinagre, A.S.; Capp, E.; da Silva, R.S.M., (1998). Ação do hormônio hiperglicêmico (CHH) sobre a glicemia de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP). In: **XIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambú, Brasil, p.382.
- Webb, K.L; Schimpf, AL, Olmon, J. (1972). Free amino acid composition of scyphozoan polyps of *Aurelia autita*, *Chrysaorra quinquecirrha*, and *Cyanea capillata* at various salinities. **Comp. Biochem. Physiol.** **43B**:653-663.
- Webster, S.G. (1993) High-affinity binding of putative molt-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) to

- membrane-bound receptors on the Y-organ of the crab *Carcinus maenas*. **Proc. R. soc. Lond. Biol.** **251**: 53-59.
- Welcomme, L.; Devos, P. (1994b). Immunological identification and biochemical characterization of a glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas* (L.). **J. Exp. Zool.**, **268**: 218-223.
- Whitney, J.O. (1974). The effects of external salinity upon lipid synthesis in the crab *Callinectes sapidus* Rathbun and in the spider crab *Libinia emarginata* Leech. **Comp. Biochem. Physiol.** **49**: 433-440.
- Wurdig, N.L. (1984). **Ostracodes do sistema lagunar de tramandaí, RS, Brasil, sistemática, ecologia e subsídios à paleoecologia**. Porto Alegre: UFRGS, 1984. Dissertação (Doutorado em Paleontologia) - Curso de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.