

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

**EFEITO DA ANOXIA E DA RECUPERAÇÃO SOBRE O  
METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DO CARANGUEJO  
*Chasmagnathus granulata* ALIMENTADO COM DIETA RICA EM  
CARBOIDRATOS OU PROTEÍNAS**

**LETÍCIA SOUZA DOS SANTOS**

**PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2004**



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

*Mestrado e Doutorado*

*Mail: [ppgfisio@vortex.ufrgs.br](mailto:ppgfisio@vortex.ufrgs.br) Page:*

*[www.ufrgs.br/ppgfisio](http://www.ufrgs.br/ppgfisio)*

*Rua Sarmiento Leite, 500 - 2º andar*

*90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil*

*Fone/Fax: (051) 3316-34-53*



**EFEITO DA ANOXIA E DA RECUPERAÇÃO SOBRE O METABOLISMO  
INTERMEDIÁRIO DO CARANGUEJO *Chasmagnathus granulata*  
ALIMENTADO COM DIETA RICA EM CARBOIDRATOS OU PROTEÍNAS**

**LETÍCIA SOUZA DOS SANTOS**

**ORIENTADOR:**

**Dr. Luiz Carlos R. Kucharski**

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

**PORTO ALEGRE, DEZEMBRO DE 2004**

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo carinho e o exemplo de “luta” e coragem.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski pela orientação, amizade, paciência e ensinamentos ao longo deste trabalho.

A Prof. Dra. Roselis Silveira M. da Silva, pelos ensinamentos e amizade.

A colega Enfermeira Marcia Koja pelo incentivo e o “empurrão” inicial á pesquisa e por me apresentar aos professores e colegas do Laboratório de Fisiologia Comparada.

Aos meus colegas: Vanessa, Ana Lúcia, Marcia, Ubirajara, Glauco, Humberto, Matheus, Gabriela, Clarissa, Mariana e Rogério pelo companheirismo, amizade e ensinamentos na realização de muitos experimentos, seminários e disciplinas; sem esquecer a “parceria” nas viagens e congressos.

A colega Alessandra, “nervinhos”, que no início do curso fui sua “sombra”. Agradeço os ensinamentos e a paciência na realização dos experimentos.

As amigas Carmen Bock e “Merelrosa” pela amizade, conselhos e muitos momentos de risadas...

Aos colegas Sandra e Zé Eduardo (parceria) pela amizade e por tornar o dia de “coleta de animais” divertido...

Aos alunos de iniciação científica, pelo trabalho, esforço e amizade no transcorrer deste trabalho.

As colegas Enfermeiras, Auxiliares de Enfermagem e equipe médica da unidade de pediatria 10º N do HCPA na qual tenho um carinho especial... Por muitos plantões agradáveis, paciência e auxílio em momentos em que já chegava para trabalhar cansada....

As colegas Enfermeiras, Técnicos de Enfermagem, secretária Iara e equipe médica da unidade de Oncologia Pediátrica 3º Leste em que atualmente trabalho,

pelo incentivo, carinho, amizade e “parceria” em muitos fins de semana de plantão.

Aos amigos da Bike-rs pela parceria e pela paciência no início de muitos momentos de “pedal”, em especial ao Edgardo, Fernando Pitibul, Valter, Fernandinho Junior e Fernanda.

As amigas Luciana Torresan e Marciane pela amizade e companheirismo em momentos agradáveis e desagradáveis... Conselhos e apoio emocional.

As amigas Veridiana Virginio e em especial à Maria Aparecida Girardi, pela amizade, companheirismo, incentivo em momentos de cansaço e em acreditar que todo o esforço “valeria a pena”.

A toda a minha família pela amizade e por entenderem a minha ausência em muitos momentos festivos, devido aos compromissos profissionais.

Um carinho especial a todas as minhas “mães”... Principalmente a Cecília e ao Flávio, o meu muito obrigado.

Aos colegas, funcionários e professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia pela convivência e amizade.

Ao CNPq, FAPERGS e PROPESQ pelo apoio financeiro ao Laboratório e ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia.

# SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	6
INTRODUÇÃO GERAL .....	8
OBJETIVOS .....	20
MATERIAL E MÉTODOS .....	21
Coleta e manutenção dos animais.....	21
Procedimentos Experimentais <i>in vivo</i> .....	22
Procedimentos experimentais <i>in vitro</i> .....	25
Tratamento Estatístico .....	27
ARTIGOS DESENVOLVIDOS.....	28
ARTIGO I.....	29
Estudo do metabolismo de carboidratos em brânquias do caranguejo <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentado com dieta rica em carboidratos ou proteínas submetido a anoxia e a recuperação da anoxia.....	29
ARTIGO II.....	54
Efeito da anoxia e da recuperação da anoxia sobre a síntese protéica no caranguejo <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentado com dieta rica em carboidratos ou proteínas.....	54
CONCLUSÕES .....	75
BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO E MÉTODOS .....	77
ANEXO .....	83

## RESUMO GERAL

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) apesar de ter evoluído de formas marinhas é uma espécie tipicamente estuarina, sendo dificilmente encontrada no mar. Em seu hábitat, o caranguejo permanece longos períodos fora da água, sendo considerado um animal tipicamente semiterrestre. As respostas fisiológicas às variações das concentrações de O<sub>2</sub> incluem alterações significativas na ventilação, na circulação, no metabolismo e nas propriedades de afinidade da hemocianina pelo O<sub>2</sub>. Estudos anteriores comprovaram que em alguns tecidos específicos da carpa *Carassius carassius* ocorre redução significativa da síntese protéica mas no cérebro não ocorre a mesma resposta metabólica, sugerindo ser esta uma das estratégias de conservação de energia.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que, após uma hora de anoxia, a glicose hemolinfática aumentou 3 e 4 vezes em animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) e rica em proteínas (RP), respectivamente. Após três horas de recuperação, os níveis glicêmicos retornaram aos valores semelhantes aos do grupo controle em ambos os tratamentos alimentares. Após uma hora de anoxia, a concentração de glicose livre nas brânquias anteriores (BA) reduziu significativamente em animais alimentados com dieta RC (70%) e RP (60%). Nas brânquias posteriores (BP) de animais alimentados com dieta RC e dieta RP, a anoxia reduziu 64% e 54% ( $p < 0,05$ ), respectivamente. Estes valores mantiveram-se reduzidos durante o período de recuperação, tanto nas BA como nas BP. Em animais alimentados com dieta RP, as concentrações de glicogênio reduziram somente após três horas de recuperação, tanto em BA como em BP, entretanto,

somente nas BA de animais alimentados com dieta RP houve um aumento de 118% ( $p < 0,05$ ) dos níveis de ATP na anoxia e 116% na recuperação aeróbica.

No hepatopâncreas, a síntese proteica reduziu 78% e 65% ( $p < 0,05$ ) na anoxia e recuperação em animais alimentados com dieta RP, respectivamente. Já nos animais alimentados com dieta RC, a síntese proteica no hepatopâncreas aumentou em 42%, na recuperação. No músculo de animais que receberam este tratamento alimentar, ocorreu um aumento de 213% ( $p < 0,05$ ) na síntese proteica durante o período de anoxia e uma redução de 12% durante o período de recuperação aeróbica.

Em caramujejos alimentados com dieta RP, a síntese proteica reduziu na anoxia 57% nas BA e 36% nas BP. Na dieta RC houve um aumento de 13% da síntese proteica nas brânquias anteriores e 8% nas brânquias posteriores durante a recuperação. Portanto, a capacidade de síntese proteica no caranguejo *C. granulata*, está relacionada com a característica funcional e a capacidade metabólica do tecidos submetidos à anoxia e à recuperação aeróbica.

Os resultados do presente estudo demonstram que durante a anoxia e a recuperação aeróbica no caranguejo *C. granulata* ocorrem ajustes metabólicos diferenciados. Estes ajustes também dependem dos tecidos analisados e das dietas administradas.

## INTRODUÇÃO GERAL

O consumo de oxigênio pelos organismos aeróbicos otimizou a produção de energia, com a oxidação completa dos substratos energéticos (carboidratos, lipídios e aminoácidos) para a formação de gás carbônico e de água. A evolução resultou em eficientes sistemas respiratórios e circulatórios para garantir o aporte adequado de oxigênio para os órgãos. Com a disponibilidade de oxigênio, várias formas de vida com alto gasto energético puderam se desenvolver, incluindo a homeotermia nos mamíferos e aves e a habilidade para locomoção rápida, como o voo e a natação (Lutz e Storey, 1997).

A partir do ambiente marinho ancestral, diferentes grupos de animais invadiram a água doce, enquanto outros migraram para a terra. A adaptação evolutiva à respiração aérea ocorreu apenas entre os artrópodes e os vertebrados (Barnes, 1984; Schmidt-Nielsen, 1996 apud Dias, 2000).

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinhos 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 como as marés e as precipitações, impõe a sua biota um elevado estresse ambiental. O estresse pode ser gerado tanto pelas variações extremas de fatores como a salinidade, e a temperatura bem como pela quantidade de  $O_2$  dissolvido no hábitat (Cooper, 1974; Odum, 1985).

Em estuários e marismas as variações extremas dos fatores ambientais, 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-as a

tolerar as alterações freqüentes das características físico-químicas do meio. A adaptação a este ambiente terrestre pode ser observada em diversos grupos de crustáceos (Pawers e Bliss, 1983; Schmitt e Santos, 1993).

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) apesar de ter evoluído de formas marinhas é uma espécie tipicamente estuarina sendo dificilmente encontrada no mar. Esta espécie habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais desde o litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, no Brasil, e ao longo de toda a Costa do Uruguai até o Golfo de São Martin na Argentina (Rathbum, 1918; Boschi, 1964).

Em seu habitat, o caranguejo *C. granulata* permanece longos períodos fora da água, sendo considerado um animal tipicamente semiterrestre (Mañe-Garzon e cols, 1974), muito embora Santos e cols. (1987) tenham verificado que o sistema respiratório desses animais está pouco adaptado à respiração aérea. Entretanto, a interiorização das brânquias na cavidade branquial e a presença de tufo de cerdas entre as bases dos pereiópodos apresentam função de transferir água para dentro da câmara branquial. A manutenção de uma corrente de circulação de água através da superfície externa do corpo, caracteriza uma circulação extracorpórea. Estas adaptações têm como finalidade a oxigenação (Hartnol, 1988) bem como a eliminação do gás carbônico (Bond-Buckup e cols., 1991) quando em respiração aérea.

O caranguejo *C. granulata* ocupa preferencialmente os pisos supra e mesolitorâneos, onde abrem galerias ou tocas com profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático, fazendo sempre com que haja água no fundo da toca. Turcato (1990) verificou que o teor de oxigênio dissolvido na água da toca varia de 2,78 mgO<sub>2</sub>/L até 11,78 mgO<sub>2</sub>/L. Porém, nos meses de inverno,

os níveis de O<sub>2</sub> dissolvido nas tocas subterrâneas atingem valores muito próximos de zero e há uma diminuição do período de atividade dos animais que permanecem por mais tempo em suas tocas ou galerias.

As respostas fisiológicas às variações das concentrações de O<sub>2</sub> incluem alterações significativas na ventilação, na circulação, no metabolismo e nas propriedades de afinidade da hemocianina pelo O<sub>2</sub>. (Oliveira, 1998). A hemocianina é um pigmento respiratório que apresenta elevado peso molecular. O metal diretamente ligado à proteína é o cobre e apresenta propriedades semelhantes às da hemoglobina, captando oxigênio quando a pressão parcial é alta e liberando-o quando a pressão é baixa. A ligação ao oxigênio com a hemocianina ocorre na proporção de 1ml de O<sub>2</sub>/g de pigmento respiratório, sendo que quando oxigenada apresenta coloração azulada, e quando desoxigenada incolor (Hill, 1980; Withers, 1992).

Hervant e cols. (1995), em um estudo comparativo de sobrevivência a hipoxia entre duas espécies de crustáceos (*Niphargus rhenohodamensis* e *Gammarus fossarum*), constatou que a diferença na capacidade de tolerância à anoxia estaria associada ao tipo de hábitat de cada espécie estudada, assim como pelas elevadas concentrações de glicogênio e arginina fosfato. A redução do metabolismo em animais com tolerância a anoxia seria a hipótese esperada devido à necessidade de manutenção da atividade celular com baixo consumo de adenosina trifosfato (ATP). A síntese protéica, em animais submetidos à anoxia, deveria estar reduzida, pois este processo gera grande consumo de energia.

Estudos anteriores comprovaram que em alguns tecidos específicos (coração, fígado e músculo) da carpa *Carassius carassius* ocorre redução significativa da síntese protéica enquanto em outro (cérebro) não ocorre a mesma resposta

metabólica, sugerindo ser esta uma das estratégias de conservação de energia (Smith e cols., 1996).

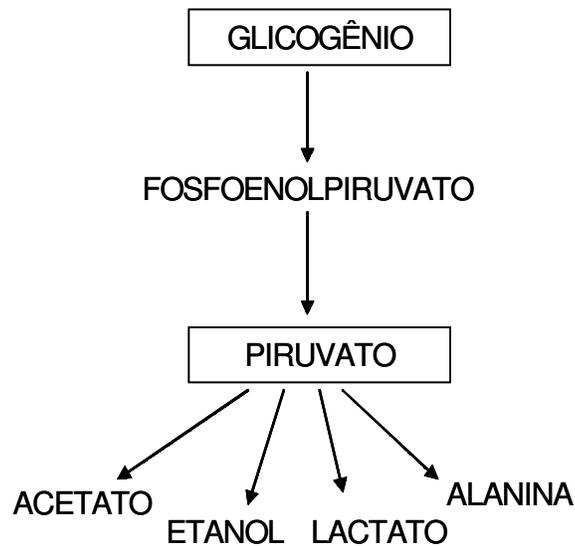
Está bem estabelecido que os crustáceos apresentam nos seus tecidos 10 vezes mais aminoácidos que nos tecidos de vertebrados, muitos destes são importantes para a via gliconeogênica (alanina, ácido glutâmico e arginina), sendo esta concentração suficiente para síntese de glicose (Thabrew e cols., 1971). Estudos realizados em *C. granulata* submetido a anoxia (Oliveira e cols., 2004) demonstraram que o hepatopâncreas possui capacidade gliconeogênica a partir do  $^{14}\text{C}$ -lactato. Oliveira e Da Silva (1997) observaram a via gliconeogênica a partir da  $^{14}\text{C}$ -alanina quando *C. granulata* foram submetido ao estresse hiposmótico.

Em caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (RP) a concentração de alguns aminoácidos na hemolinfa (arginina, alanina e prolina) de caranguejos submetidos ao estresse hiperosmótico aumentou 2 a 3 vezes quando comparados ao grupo controle (Schein, 1999). No entanto Vinagre e Da Silva (1992) estudando o metabolismo de proteínas no caranguejo *C. granulata*, demonstrou que as dietas ricas em carboidratos ou proteínas não determinam diferenças significativas na concentração de proteínas totais nos tecidos hepatopâncreático, muscular e branquial.

Em mamíferos, a dieta rica em carboidratos resulta na elevação da atividade da piruvato kinase (PK) no fígado e no tecido adiposo, com aumento da concentração de piruvato (Brito e cols, 2001).

O oxalacetato é convertido a fosfoenolpiruvato (PEP) e após a piruvato, reação catalizada pela enzima, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a piruvato quinase (PK), respectivamente. Este piruvato formado pode seguir duas vias: ser transportado para as mitocôndrias e ser convertido à acetil-Coa e então ser

completamente oxidado no ciclo de Krebs ou pode ser transaminado a alanina na reação catalisada pela alanina aminotransferase (Fig. 1). Assim, este piruvato produzido a partir da glicose pode formar alanina pelo ciclo de glicose/alanina entre o músculo e o fígado (Newsholme-Leech,1983).



Produto final do metabolismo anaeróbico (Retirado de Urich, 1994).

Lyndon e Houlihan (1998), em sua revisão sobre a renovação de proteínas em brânquias de peixes e crustáceos, demonstraram que o tecido branquial é o mais ativo em termos de síntese de proteínas, seguido pelo fígado e hepatopâncreas, músculo e coração. O estudo sugere que o tecido branquial apresenta um elevado grau de plasticidade do metabolismo protéico mesmo em condições adversas, o que assegura a manutenção da integridade das funções branquiais, sendo de grande importância para a sobrevivência do animal. Esses dados são concordantes com os resultados encontrados por Schein (1999), onde os valores de síntese protéica no tecido branquial foram 100 vezes maiores que aqueles obtidos no hepatopâncreas e no músculo.

Nos crustáceos eurialinos, a investigação estrutural do epitélio branquial (Tausch cols., 1989) demonstra que as mesmas apresentam diferenças funcionais. As brânquias posteriores são responsáveis pela osmorregulação, por possuindo alta atividade  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase realizada em células transportadoras de  $\text{Na}^+$  na membrana basolateral, enquanto que as brânquias anteriores apresentam função respiratória (Péqueux e Gilles, 1988).

Estudo realizado por Oliveira (1998) em *C. granulata* demonstrou que a composição da dieta oferecida aos animais diferencia o padrão de resposta do metabolismo de carboidratos. Após 8 horas de anoxia, ocorrem diferença nas concentrações de glicogênio e aumento na atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), em caranguejos alimentados com dieta RP. Marqueze (2004) verificou que a anoxia promoveu redução das concentrações de ATP, glicogênio e atividade da PK no hepatopâncreas de *C. granulata* alimentado com dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas. A hexoquinase (HK) aumentou somente no hepatopâncreas de animais alimentados com dieta RC. Nery e Santos (1993) observaram alterações nas concentrações de glicose e glicogênio na hemolinfa, brânquias, músculo e hepatopâncreas de caranguejos *C. granulata* submetido ao estresse hiposmótico durante o inverno e verão. Henry e cols. (1994) observaram variações na síntese e manutenção de energia durante o exercício, em três espécies de crustáceos decápodos: *Callinectes sapidus*, *Cardisoma guanhumi* e *Gecarcinus lateralis*.

A via gliconeogênica é responsável pela síntese *de novo* de glicose e glicogênio utilizando como precursores substratos que não carboidratos, como lactato, aminoácidos, piruvato e glicerol (Moon, 1988). O lactato é produzido geralmente em condições de hipoxia ou anóxia (Schmitt e Santos, 1993).

Recentemente, Schein e cols. (2004) comprovaram o envolvimento da via gliconeogênica muscular no processo de ajuste metabólico ao estresse hiperosmótico no caranguejo *C. granulata* alimentado com dieta rica em proteínas (RP).

Nos tecidos são conhecidos dois ciclos que envolvem a gliconeogênese: o ciclo de Cori e o ciclo da alanina. Ambos são mecanismos para suprir os tecidos de glicose como fonte de energia. Entretanto, em algumas situações só funcionam em tecidos que não oxidam completamente a glicose a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, liberando alanina ou lactato como produtos finais do metabolismo anaeróbico da glicose. A consequência disso é que 5 a 7 moléculas de ATP podem ser formadas por molécula de glicose nos tecidos periféricos que participam do ciclo da alanina e duas moléculas de ATP no ciclo de Cori (Devlin, 2003).

A glicose é o principal monossacarídeo na hemolinfa de crustáceos e a mais importante fonte energética (Chang e O'Connor, 1983; Herreid e Full, 1988). Os níveis de glicose dependem do estágio de muda, da estação do ano, da dieta administrada, do ciclo circadiano, do estado alimentar e da concentração do hormônio hiperglicemiante (CHH).

Kucharski e Da Silva (1991 a; b) verificaram que o padrão do metabolismo energético do *C. granulata* apresenta mudanças marcantes em função do conteúdo de carboidratos ou proteínas contidos na dieta administrada. Nos caranguejos 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 àqueles do grupo mantido com dieta protéica. Estes autores investigaram ainda o efeito da variação sazonal sobre o metabolismo energético do caranguejo *C. granulata*, demonstrando 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 lipídios musculares seriam o substrato energético preferencial.

Vinagre (1999), realizou estudos com o intuito de verificar os efeitos da ablação dos pedúnculos oculares sobre a atividade metabólica de *C. granulata* submetidos ao choque hiposmótico, após tratamento com as dietas RC ou RP. A autora demonstrou que ao final do período de 48 horas de ablação dos pedunculos oculares, os caranguejos alimentados com a dieta RP apresentaram redução de 30% da glicose hemolinfática, enquanto que aqueles alimentados com dieta RC reduziram em 60% os níveis de glicose na hemolinfa, em relação aos valores dos caranguejos pré-apedunculados e do grupo controle. Entretanto, após 12 horas de estresse hiposmótico, tanto os animais apedunculados alimentados com dieta RC como aqueles alimentados com dieta RP, apresentaram hiperglicemia, recuperando seus valores iniciais após 16 horas de estresse osmótico. O autor concluiu que, apesar da ablação bilateral dos pedúnculos oculares, os animais foram capazes de aumentar a concentração de glicose na hemolinfa, a qual atingiu valores de concentração semelhantes aqueles dos caranguejos íntegros sendo capazes de mobilizar as reservas de glicogênio. Este fato indica que há síntese e liberação de peptídeos da família do CHH de localizações que não nos pedúnculos oculares do sistema nervoso central (Chang e Keller., 1998; Gu e cols., 2000). Foram encontradas concentrações pequenas, mas significativas de imunoreatividade do CHH na hemolinfa de lagostas que foram apedúnculos por mais de um ano (Chang e Keller., 1998).

O hormônio hiperglicemiante (CHH) é um peptídeo com cerca de 72-74 resíduos de aminoácidos cujo peso molecular varia entre 6-9KDa (Keller, 1992;

Kummer e Keller, 1993; Sefiani e cols, 1996; Smullen e cols, 1996; Soyez, 1997 apud Vinagre, 1999). Este hormônio está envolvido na regulação do metabolismo dos carboidratos em crustáceos. É produzido e secretado pelo complexo órgão x-glândula do seio o qual, secreta o CHH na hemolinfa (Keller, 1992; Santos e Keller, 1993). No caranguejo *C. granulata* foi observada elevação da concentração de glicose hemolinfática uma hora após a injeção de extrato do pedúnculo ocular (Santos e cols., 1987). Morris e Adamczewska (2002) em estudo do metabolismo do caranguejo migratório *Gecarcoidea natalis* mencionam que o CHH, apresenta variação sazonal de sensibilidade ao hormônio. Estudos em lagostins *Ornectes limosus* demonstraram que os níveis de CHH podem ser alterados conforme o estado nutricional, o ritmo circadiano, a temperatura e os níveis de oxigênio.

Em duas espécies de crustáceos, Santos e Keller (1993) verificaram que os níveis de CHH hemolinfático diminuíram após injeção de glicose e aumentaram após administração de lactato. Oliveira (1998) observou que a primeira hora de anoxia ambiental em *C. granulata* alimentados com dieta rica em carboidratos, provocou um aumento na concentração de glicose na hemolinfa, sugerindo que a mobilização de glicose dos tecidos (muscular e branquial) excedeu a sua utilização na via glicolítica determinando o acúmulo de glicose na hemolinfa. Em outros trabalhos realizados em crustáceos, foi verificado que a exposição dos caranguejos a hipoxia ou a anóxia ambiental provoca hiperglicemia (Van Aardt, 1988; Gonçalves, 1993).

O glicogênio é armazenado em altas concentrações nos diferentes tecidos do crustáceo *C. granulata* (Kucharski e da Silva, 1991 a, b; Vinagre e Da Silva, 1992; Nery e Santos, 1993; Schein, 1999; Oliveira e cols., 2001). Em crustáceos, o ciclo de estocagem/mobilização de glicogênio é controlado pelos estágios da muda, variação sazonal, ciclo reprodutivo, períodos de escassez de alimentos e estresse osmótico,

entre outros fatores (Kucharski e Da Silva, 1991 a, b; Vinagre e Da Silva, 1992; Oliveira e Da Silva, 2000). A ausência de um depósito central de glicogênio seria uma adaptação importante para animais que em seu hábitat estariam submetidos a períodos de hipóxia ambiental e que possuem o sistema circulatório do tipo aberto, determinando assim uma distribuição menos efetiva de glicose para os tecidos (Hochachka e Somero, 1984; Santos e Keller, 1993).

Johnston e Davies (1972) mencionaram referem que os hemócitos presentes na hemolinfa dos invertebrados apresentam polissacarídeos de alto peso molecular (glicogênio), onde a função principal, similarmente ao hepatopâncreas, seria a degradação do glicogênio, liberando glicose para a hemolinfa. Assim fica evidenciada a necessidade de estoques circulantes de carboidratos além dos tecidos.

Johnston e cols. (1973), em estudo com o caranguejo *Carcinus maenas*, realizaram uma análise histoquímica de hemócitos e de células hepatopancreáticas. Foi sugerido que os hemócitos, além de importante função no metabolismo intermediário, devido à presença de células do tipo  $\alpha$ , apresentam aminoácidos livres envolvidos na regulação isosmótica. Já o tecido hepatopancreático, além de secreção de enzimas digestivas, também estaria envolvido no metabolismo de lipídios devido às suas reservas (Kucharski e Da Silva, 1991b; Schmitt e Santos, 1993).

Vários trabalhos têm demonstrado, em diferentes espécies de crustáceos, que o glicogênio é um importante substrato para o metabolismo anaeróbico (glicólise anaeróbica). Entretanto, o lactato é o produto final da degradação anaeróbica da glicose. Para muitos tecidos, a glicólise anaeróbica é uma via fornecedora de energia de emergência, capaz de gerar 2 moles de adenosina trifosfato (ATP) para 1

mol de glicose, na ausência de oxigênio molecular. Assim os níveis de ATP ainda podem ser mantidos pelo menos por um curto período de tempo (Devlin, 2003). A glicólise também pode ocorrer em células com suprimento abundante de oxigênio, desde que as mesmas contenham mitocôndrias (Devlin, 2003). O produto final da glicólise anaeróbica é o piruvato, e pela ação da enzima piruvato desidrogenase, há formação de Acetil-CoA que será oxidada no ciclo de Krebs a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O gerando 36-38 moles de ATP por 1 mol de glicose (Marks e cols., 1996; Devlin, 2003).

Pasteur (1861) demonstrou, em levedura de cerveja que o oxigênio inibe a fermentação e que o consumo de glicose é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio. Portanto, a via glicolítica é positivamente regulada pela hipoxia, sendo um dos moduladores da via glicolítica. Este efeito foi evidenciado em diferentes células e tecidos de invertebrados e vertebrados (Hochachka e Lutz, 2001). Em reconhecimento a Louis Pasteur, este fenômeno é conhecido mundialmente como “Efeito Pasteur”.

Existem vários trabalhos realizados com relação a diferentes tipos de estresse ambiental (anóxico, hipóxico, osmótico e jejum) ao qual o caranguejo *C. granulata* é submetido (Kucharski e Da Silva, 1991a; Vinagre e Da Silva, 1992; Schein, 1999; Chittó, 2000; Vinagre e Da Silva, 2002). Trapp (2000) verificou a autofosforilação do receptor e transdução do sinal da insulina no *C. granulata* submetidos a diferentes dietas e ao jejum. Também foi investigado o metabolismo dos carboidratos no caranguejo *C. granulata* submetido a anoxia e a recuperação aeróbica (Oliveira, 1998) com diferentes e prolongados tempos de anoxia e de recuperação. Oliveira (2003) verificou o efeito da anoxia ambiental e de diferentes períodos de reoxigenação no balanço oxidativo, atividade das enzimas antioxidantes e a capacidade antioxidante não-enzimática do caranguejo. Marqueze (2004) estudou o

metabolismo de carboidratos e a atividade de importantes enzimas envolvidas na via glicolítica (PK e HK) em caranguejos alimentados com dieta RC e RP submetidos a uma hora de anoxia e a três horas de recuperação aeróbica.

De uma maneira geral, os resultados dos estudos apresentados acima forneceram informações importantes para que se ampliasse o conhecimento do controle do metabolismo de carboidratos, bem como da capacidade de síntese protéica do *C. granulata* alimentados com dietas ricas em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP) durante a anóxia e a recuperação da anóxia.

## OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo determinar o efeito da anóxia e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos e sobre a síntese de proteínas no caranguejo *Chasmagnathus granulata* alimentado previamente com dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP).

Os objetivos específicos foram:

- ❖ Avaliar a concentração da glicose na hemolinfa do caranguejo *C. granulata* alimentado com dieta RC ou RP nos grupos controle, anoxia e recuperação da anoxia;
- ❖ Avaliar os níveis de glicogênio, glicose livre e ATP (adenosina trifosfato) nas brânquias anteriores e posteriores do caranguejo *C. granulata* submetido a anoxia e a recuperação da anoxia;
- ❖ Avaliar a capacidade de síntese protéica nas brânquias anteriores, brânquias posteriores, músculo e hepatopâncreas, do caranguejo *C. granulata* alimentado com dieta RC ou RP nos grupos controle, anoxia e recuperação da anoxia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e manutenção dos caranguejos

Os caranguejos utilizados neste estudo foram coletados em marismas, localizado na margem leste da Lagoa de Tramandaí (coordenadas 29° 58´ latitude Sul e 58° 08´ longitude Oeste) no município de Tramandaí no Rio Grande do Sul, Brasil. O clima da região é considerado subtropical úmido, com temperatura média anual de 17,6°C e precipitação pluviométrica inferior a 1300mm anuais (Moreno, 1961).

Os caranguejos foram coletados manualmente no sedimento areno-lodoso, dentro da água ou nas tocas e transportados até o Laboratório em caixas plásticas com água do próprio local; com a permissão de autoridades do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA - portaria nº 332/90). Foram utilizados somente caranguejos machos, adultos e no período de intermuda, a fim de minimizar possíveis efeitos fisiológicos do ciclo reprodutivo (Chittó, 2000).

No laboratório, os caranguejos foram mantidos em aquários contendo água com aeração, salinidade de 20‰, temperatura de 25± 2°C e fotoperíodo natural. Foram administrados dois tratamentos: caranguejos alimentados *ad libitum* com carne bovina crua (grupo RP) ou arroz cozido (grupo RC), por um período de duas semanas.

Após o período de aclimação às dietas, os caranguejos foram colocados em um aquário com 20 litros de água, salinidade de 20‰ e temperatura de 25°C. O

oxigênio foi substituído por gás nitrogênio (AGA-American Gás Association) durante 40 min. para que a  $PO_2$  atingisse 0% (monitorado com um oxímetro Oxel-I/ISO2). Passados 40 minutos gaseificação com o gás nitrogênio, o aquário foi lacrado com filme plástico e os animais foram submetidos por uma hora de anoxia.

Após o período experimental, parte dos caranguejos foram retirados do aquário para posterior análise e os demais caranguejos, foram submetidos a três horas de recuperação da anoxia (reoxigenação) em aquário aerado com salinidade de 20‰, conforme método descrito por Oliveira e cols. (2001).

Os caranguejos do grupo controle (C) permaneceram em condições aeróbicas.

### **Procedimentos Experimentais *in vivo***

A hemolinfa foi coletada por punção do seio hemolinfático nas articulações do 4º e 5º pereiópodos utilizando-se seringas de 1 mL e anticoagulante oxalato de potássio a 10% para ser determinada a concentração de glicose na hemolinfa. Após o período experimental os caranguejos foram crionestesiados e a carapaça removida. As brânquias anteriores e posteriores foram dissecadas para a determinação das concentrações de glicogênio, glicose livre e ATP.

Os caranguejos do grupo controle foram sacrificados no mesmo dia que aqueles dos grupos anoxia e recuperação.

### **Concentração de glicose na hemolinfa**

Os níveis de glicose na hemolinfa foram determinados pelo método colorimétrico enzimático da glicose-oxidase com o kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). Os resultados foram expressos em mg/dL.

### **Concentração de glicose livre nos tecidos**

A concentração de glicose livre foi determinada pelo método descrito por Carr e Neff (1984). As amostras de tecidos foram pesadas e homogeneizadas com ultraturrax (OMNIMIXER) em uma solução de citrato de sódio 100 mM, fervidas por 10 min., agitadas e resfriadas à temperatura ambiente. Com o objetivo de retirar a fração lipídica, foi adicionada uma solução de clorofórmio-metanol na proporção de (2:1 v/v). Após as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2700rpm. Foi utilizado o sobrenadante (60 µL) para medir a concentração de glicose livre a qual determinada pelo método colorimétrico enzimático da glicose-oxidase (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). Os resultados foram expressos em mg de glicose livre/g de tecido.

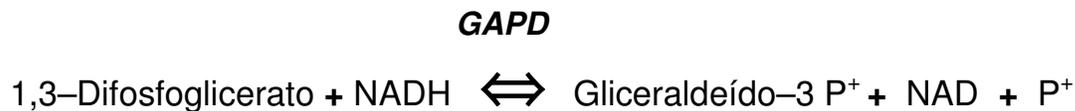
### **Concentração de Glicogênio nos tecidos**

O isolamento do glicogênio das brânquias anteriores e posteriores seguiram o método descrito por Van Handel (1965) e determinado como glicose após a hidrólise ácida como descrito por Geary e cols. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase com kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda)

com 60 µL de amostra. A concentração de glicogênio foi expressa em gramas por cento (g %) de tecido úmido.

### **Concentração do adenosina trifosfato (ATP)**

A concentração de adenosina trifosfato (ATP) foi determinada nas brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) conforme reação abaixo (Pothin, 1999):



- ❖ **GAPD** – Gliceraldeído desidrogenase
- ❖ **PGK** – Fosfoglicerato fosfoquinase

O tecido foi homogeneizado com TCA 6% em ultra-turrax na proporção de: 5mL/g de tecido e centrifugado durante 3 min. à 10.000 rpm em uma microcentrífuga (Eppendorf – 5402) com temperatura de 4°C. O sobrenadante foi coletado e congelado em tubos do tipo eppendorf para posterior ensaio, o qual foi realizado em até 24 horas após a preparação do tecido.

**Ensaio:** o vial do Kit contém 380 nmol (0,3 mg) de NADH: 1,65 mL da solução tamponada de ácido fosfoglicérico (PGA) e 3,1 mL de água destilada.

Na cubeta do espectrofotômetro, foram adicionados 940 µL da solução substrato e 50 µL da amostra do tecido homogeneizado. Após um período de 30

segundos de estabilização foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de uma mistura das enzimas GAPD/PGK, agitando-se a seguir o conteúdo da cubeta.

A leitura e o registro das absorvâncias foram realizados num espectrofotômetro (Ultrospec 2000 UV / visible-Pharmacia Biotech) a 340 nm com uma cubeta (Quartzo – 500  $\mu\text{L}$ ) contendo água destilada como referência. A leitura foi realizada aproximadamente durante dois minutos quando a absorvância final foi alcançada. Os valores de ATP foram expressos como  $\mu\text{mol}$  ATP por mg de tecido.

### **Procedimentos experimentais *in vitro***

#### **Síntese de Proteínas**

A análise da síntese protéica foi realizada conforme método descrito por Richardson e cols. (1997). Amostras dos tecidos (hepatopâncreas, músculo, brânquias anteriores e posteriores) foram colocadas em tubos do tipo ependorf de 2 mL contendo 500  $\mu\text{L}$  de solução fisiológica de caranguejos (SFC) gelada a 300 mM (pH 7,8) acrescida de 10 mM HEPES; 0,1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF); 0,2  $\mu\text{Ci}$  de L-leucina- $\text{U-}^{14}\text{C}$  (310 mCi/mmol – Amersham International) e 5 mM de L-leucina no meio de incubação. Os tubos foram aerados por 30 segundos com carbogênio ( $\text{O}_2:\text{CO}_2$ . 95:5% v/v) e incubados em banho metabólico (25°C) sob agitação constante por quatro horas (Schein, 1999).

Após o período de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, os tecidos lavados por três vezes em solução fisiológica de caranguejo (SFC) gelada para tirar o excesso de radioatividade, secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 500  $\mu\text{L}$  de água bidestilada. As amostras

foram homogeneizadas (OMNIMER), onde 250  $\mu$ L da amostra foram aplicados em filtros de microfibra de vidro (GF/B, 24mm, Whatman) e após processadas para quantificação de  $^{14}$ C-proteínas totais.

Os filtros foram lavados com TCA 10% por 15 minutos, para que ocorresse a precipitação das  $^{14}$ C-proteínas, seguidos por duas lavagens com álcool 95% e duas vezes com éter. Após secos os filtros foram colocados em tubo plástico descartável com 2 mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1 0,4%; POPOP 0,01%) e a radioatividade foi quantificada em contador LBK-Wallac com 97% de eficiência. As proteínas totais (10  $\mu$ L da amostra) foram quantificadas conforme método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão.

Os resultados foram expressos em  $^{14}$ C-leucina - incorporada em proteína ( $\mu$ mol/mg/h).

## Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste “t” de Student para dados não pareados entre os grupos controles. Para os grupos experimentais foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via e para os tratamentos alimentares (dieta RC ou RP) utilizada análise de variância de duas vias (ANOVA) com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

## ARTIGOS DESENVOLVIDOS

Posteriormente será feita a versão dos artigos para o inglês e algumas adaptações na estrutura conforme as regras definidas pela revista ***Comparative Biochemistry and Physiology***.

## ARTIGO I

**Estudo do metabolismo de carboidratos em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* alimentado com dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetido a anoxia e a recuperação da anoxia**

Autores: **Letícia S. dos Santos**, Luciana T. Habekost; Luiz Carlos Kucharski

Porto Alegre, dezembro de 2004

## Resumo

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* é uma espécie típica estuarina que evoluiu de formas marinhas. Em seu habitat, permanece por longos períodos fora da água. Algumas estratégias adaptativas permitem aos animais a sobrevivência durante a hipoxia ou anoxia ambiental: manutenção de altas concentrações de glicogênio e fosfato (arginina fosfato); utilização de vias anaeróbicas para a produção de ATP e redução do metabolismo. O presente estudo teve como finalidade avaliar o metabolismo de carboidratos em diferentes tecidos de *C. granulata* submetidos a anoxia e a recuperação da anoxia em caranguejos alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou rica em proteínas (RP).

Os resultados dos experimentos demonstram que uma hora de anoxia a glicose hemolinfática aumentou 3 e 4 vezes em animais alimentados com dieta RC e RP, respectivamente. Entretanto, após três horas de recuperação, os níveis glicêmicos retornaram a valores semelhantes aos do grupo controle em ambos os tratamentos alimentares. A concentração de glicose livre, tanto nas brânquias anteriores (BA) como nas brânquias posteriores (BP), em animais alimentados com dieta RC ou RP reduziram ( $p < 0,05$ ) após uma hora de anoxia, mantendo-se reduzidos durante o período de recuperação da anoxia. As concentrações de glicogênio reduziram somente após três horas de recuperação, tanto em BA como em BP, em animais alimentados com dieta RP. Entretanto, somente nas BA de caranguejos alimentados com dieta RP o nível de ATP aumentou ( $p < 0,05$ ) na anoxia e na recuperação aeróbica.

Os resultados do presente estudo indicam que a dieta administrada determina diferentes padrões de ajustes metabólicos nas BA e BP do caranguejo *C. granulata*, submetido a anoxia e a recuperação aeróbica.

**Palavras chave:** anoxia, ATP, caranguejos, decápodos, glicose, metabolismo, recuperação aeróbica.

## INTRODUÇÃO

*Chasmagnathus granulata*, um caranguejo da família Grapsidae (Decapoda, Crustácea), é uma espécie típica de estuário que evoluiu a partir de formas marinhas. Ele habita pântanos salgados ou marismas 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 (Boschi, 1964).

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinhos 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 como as marés e as precipitações, impõe a sua biota um elevado estresse ambiental (Cooper, 1974; Odum, 1985). Mudanças tanto comportamentais como estruturais e funcionais (Kinne, 1964 apud Miranda, 1994) ocorrem nos organismos lagunares e estuarinos, capacitando-as a tolerar as alterações freqüentes das características físico-químicas do meio.

Está descrito na literatura que existem estratégias adaptativas que permitem a sobrevivência durante a hipoxia ou anoxia ambiental sendo que a manutenção de altas concentrações de glicogênio e energia sob a forma de fosfato (arginina fosfato) em todos os tecidos. Em condições aeróbicas; observa-se a utilização de vias anaeróbicas para a produção de ATP e a redução do gasto energético (Hervant e cols., 1995; Childress e Seibel, 1998). Respostas comportamentais, respiratórias, circulatórias e de afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub> foram constatadas em crustáceos durante a hipóxia ou anoxia ambiental (Cooper, 1974; Odum, 1985 apud Schein, 1999).

Em seu habitat, o caranguejo *C. granulata* permanece longos períodos fora da água, sendo considerado um animal tipicamente semiterrestre (Mañe-Garzon e cols, 1974), muito embora Santos e cols (1987) tenham verificado que o sistema respiratório desses animais está pouco adaptado à respiração aérea. Entretanto, a interiorização das brânquias na cavidade branquial e a presença de tufo de cerdas na base dos pereiópodos apresentam função de transferir água para dentro da câmara branquial. A manutenção de uma corrente de circulação de água através da superfície externa do corpo, caracteriza uma circulação extracorpórea. Estas adaptações têm como finalidade a oxigenação (Hartnol, 1988), assim como eliminação do gás carbônico (Bond-Buckup e cols, 1991) quando em respiração aérea.

A glicose é armazenada sob a forma de glicogênio em diferentes tecidos, tanto em vertebrados como em invertebrados (Devlin, 2003). Este substrato é o principal monossacarídeo encontrado na hemolinfa e também é armazenada sob a forma de glicogênio principalmente no músculo, hepatopâncreas, coração, hemócitos e brânquias. O ciclo de armazenamento/mobilização de glicogênio e os valores de glicose hemolinfática apresentam flutuações marcantes, dependendo, entre outros fatores, do estágio da muda, da estação do ano, da dieta oferecida, do estado alimentar, do ritmo circadiano, da salinidade do meio ambiente e do teor de oxigênio dissolvido na água (Vinagre e Da Silva, 1992; Kucharski e Da Silva, 1991; Morries e Airries, 1998; Oliveira e cols., 2004). A ausência de um depósito central de glicogênio demonstra uma adaptação importante para animais que possuem o sistema circulatório do tipo aberto com baixa pressão e fluxo lento, determinando uma distribuição menos efetiva de glicose para os tecidos (Hochachka e Somero, 1984).

As concentrações de ATP, AMP e ADP em crustáceos decápodos não são elevadas. Entretanto as concentrações de arginina fosfato no músculo destes crustáceos são elevadas, em comparação aos insetos e maiores do que creatina fosfato em vertebrados (Beis e Newsholme,1975; England e Baldwin, 1983). A arginina fosfato em crustáceos decapodas é muito utilizada na atividade muscular intensa e em períodos de hipoxia (Hill e col., 1991b; Speed e cols., 2001). Durante as pausas, após exercício intermitente no caranguejo fantasma *Ocypode*, há primeiramente restauração dos níveis de arginina fosfato do que o ATP (Weinstein e Full, 1998 apud Morris e Adamczewska, 2002). Experimentos realizados em caranguejos *Gecarcoidea natalis* demonstram que a restauração de compostos de alta energia (arginina fosfato) geralmente ocorre mais rapidamente do que a remoção do lactato. O exercício intenso resulta na produção de lactato tanto no músculo como na hemolinfa de *G. natalis* o qual será metabolizado ao longo do período de recuperação (Morris e Adamczewska, 2002).

Oliveira e cols. (2004), em estudo com *C. granulata*, verificou que tanto caranguejos alimentados com dieta RP quanto aqueles alimentados com dieta RC, os níveis de L-lactato na hemolinfa aumentaram significativamente após uma hora de anoxia, enquanto que a síntese de glicose no hepatopâncreas a partir do <sup>14</sup>C-lactato, aumentou após duas horas de anoxia em ambos os tratamentos alimentares. Os valores de L-lactato na hemolinfa reduziram gradativamente com dezoito horas de recuperação nos caranguejos alimentados com dieta RC, e reduziu significativamente atingindo valores semelhantes ao do grupo controle com dezoito horas de recuperação nos animais alimentados com dieta RP.

Baseado nestas evidências, o presente estudo teve como objetivo avaliar o metabolismo de carboidratos em *C. granulata* submetidos a anoxia e a recuperação

da anoxia em caranguejos previamente alimentados com dietas rica em carboidratos (arroz cozido) ou proteínas (carne crua bovina).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta e manutenção dos animais**

A coleta dos caranguejos *Chasmagnathus granulata*, utilizados no presente estudo foi realizada na Lagoa de Tramandaí, município de Imbé no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com a permissão das autoridades do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – portaria nº 332/90).

No laboratório os caranguejos foram mantidos em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo natural e aeração constante. Estes foram subdivididos em dois tratamentos dietéticos, sendo alimentados *ad libitum*, ao final da tarde, com dieta rica em proteínas (carne crua) ou rica em carboidratos (arroz cozido) durante 15 dias.

Após o período de aclimação às dietas, os caranguejos foram colocados em um aquário onde o oxigênio foi substituído por gás nitrogênio (AGA-American Gás Association) e gaseificado por 40 minutos, para que a  $PO_2$  atingisse 0% (monitorado com um oxímetro Oxel-I/ISO2). Passados 40 minutos de gaseificação com gás nitrogênio ( $N_2$ ) o aquário foi lacrado com filme plástico e os caranguejos foram submetidos por uma hora de anoxia. Após o período experimental parte dos animais foi retirados para análise, enquanto os demais, foram submetidos a três horas de recuperação da anoxia (reoxigenação) em aquário aerado contendo água na salinidade de 20‰. Os caranguejos do grupo controle (C) permaneceram em

condições aeróbicas (Oliveira e cols., 2001).

Após o período experimental, os caranguejos foram crionestesiados e amostras de hemolinfa, brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) foram coletadas para realização das dosagens bioquímicas.

### **Determinação da concentração de glicose na hemolinfa**

A hemolinfa foi coletada por punção do seio hemolinfático nas articulações do 4º e 5º pereiópodos, utilizando-se seringas de 1 mL e anticoagulante oxalato de potássio a 10%. Os níveis de glicose na hemolinfa foram determinados pelo método enzimático da glicose-oxidase com o kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). Os resultados foram expressos em mg/dL.

### **Determinação da concentração da glicose livre**

Os níveis de glicose livre nos diferentes tecidos foram determinados conforme método descrito por Carr e Neff (1984). A concentração de glicose livre foi medida pelo método enzimático da glicose –oxidase com o kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). Os resultados foram expressos em mg de glicose livre/g de peso úmido de tecido.

### **Isolamento e determinação do glicogênio**

O isolamento do glicogênio das brânquias anteriores e posteriores seguiu o método descrito por Van Handel (1965) sendo este determinado como glicose após

a hidrólise ácida, como descrito por Geary e cols. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). A concentração de glicogênio foi expressa em g % de tecido úmido.

### **Determinação de Adenosina Trifosfato (ATP)**

As brânquias anteriores e posteriores dos diferentes grupos experimentais foram homeogeneizadas em TCA 6% gelado (1:5 p/v) no homogeneizador Omni Mixer. O homogenado foi centrifugado a 10.000 *g* por 3 min a 4°C (Pothin 1999). O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi usado para determinar a concentração de ATP com o Kit Sigma Diagnose (nº 366-A). Os valores de ATP foram expressos como  $\mu\text{mol ATP}$  por mg de tecido.

### **TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste “t” de Student para dados não pareados entre os grupos controles das diferentes dietas. Para os grupos experimentais foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via e para os tratamentos alimentares (dietas RC ou RP) foi utilizada análise de variância de duas vias (ANOVA) com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

## RESULTADOS

Os níveis de glicose na hemolinfa do caranguejo *Chasmagnathus granulata* alimentado com dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP) durante a anoxia e a recuperação da anoxia são mostrados na figura 1. Após uma hora de anoxia, os valores glicêmicos aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) em três vezes nos animais alimentados com dieta RC e em quatro vezes naqueles alimentados com dieta RP, quando comparados aos caranguejos do grupo controle.

Na recuperação da anoxia, os valores glicêmicos retornaram a valores semelhantes aos do grupo controle em ambos os tratamentos experimentais (dieta RC ou RP). Os tratamentos experimentais não apresentaram diferenças significativas entre si.

A concentração de glicose livre nas brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) do caranguejo *C. granulata* submetidos a anoxia e à recuperação da anoxia são mostrados na figura 2. Nas BA (fig 2A), tanto os animais alimentados com dieta RC como aqueles alimentados com dieta RP, apresentaram uma redução significativa dos valores de glicose livre no grupo anoxia, quando comparados aos valores observados no grupo controle.

Na recuperação da anoxia, os níveis de glicose livre nas BA, foram significativamente menores em caranguejos alimentados com dieta RC ou RP quando comparado ao grupo anoxia.

Animais alimentados com dieta RC apresentaram significativamente maiores concentrações de glicose no grupo controle do que animais alimentados com dieta RP, tanto em brânquias anteriores como nas brânquias posteriores.

Os resultados de glicose livre encontrado nas BP (fig 2B) foram semelhantes

aos das BA. Em caranguejos alimentados com dietas RC ou RP, a anoxia reduziu a concentração de glicose livre, sendo que estes valores mantiveram-se reduzidos na recuperação da anoxia.

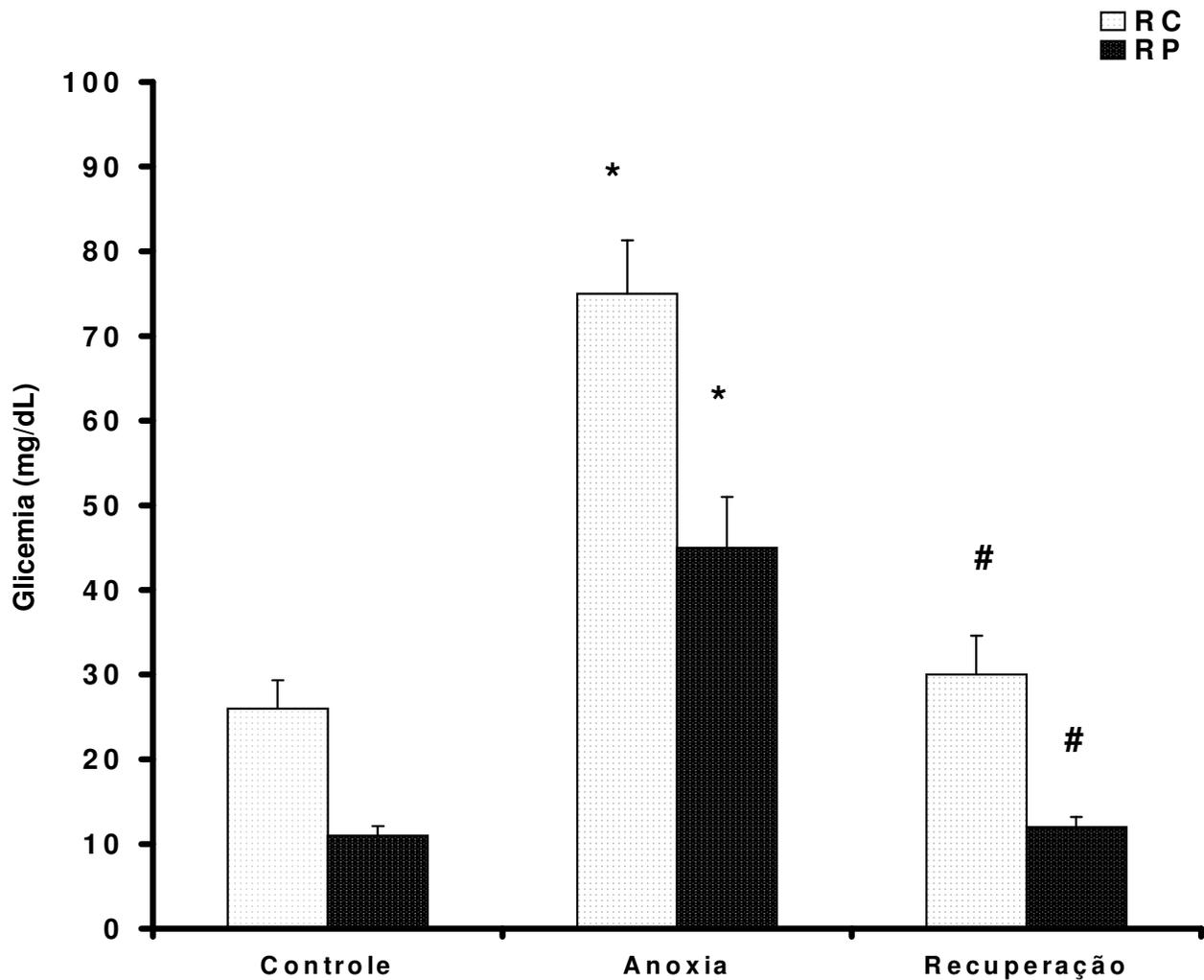
A concentração de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *C. granulata* alimentados com dietas RC ou RP e submetidos a anoxia e a recuperação da anoxia pode ser observada na figura 3.

Nas brânquias anteriores (fig. 3A), assim como nas brânquias posteriores (fig. 3B) de caranguejos alimentados com dieta RC, não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Entretanto, em animais alimentados com dieta RP, houve uma redução significativa de 73% em BA e 76% em BP ( $p < 0,05$ ) nos níveis de glicogênio na recuperação aeróbica, quando comparado ao grupo controle e anoxia.

No grupo controle foi observado um nível significativamente menor (38%) de glicogênio nas brânquias anteriores (fig. 3A), quando comparado com as brânquias posteriores (fig. 3B) em animais alimentados com dieta RC. Entretanto, em animais alimentados com dieta RP, não houve diferença significativa entre os níveis de glicogênio em ambos os tipos brânquias.

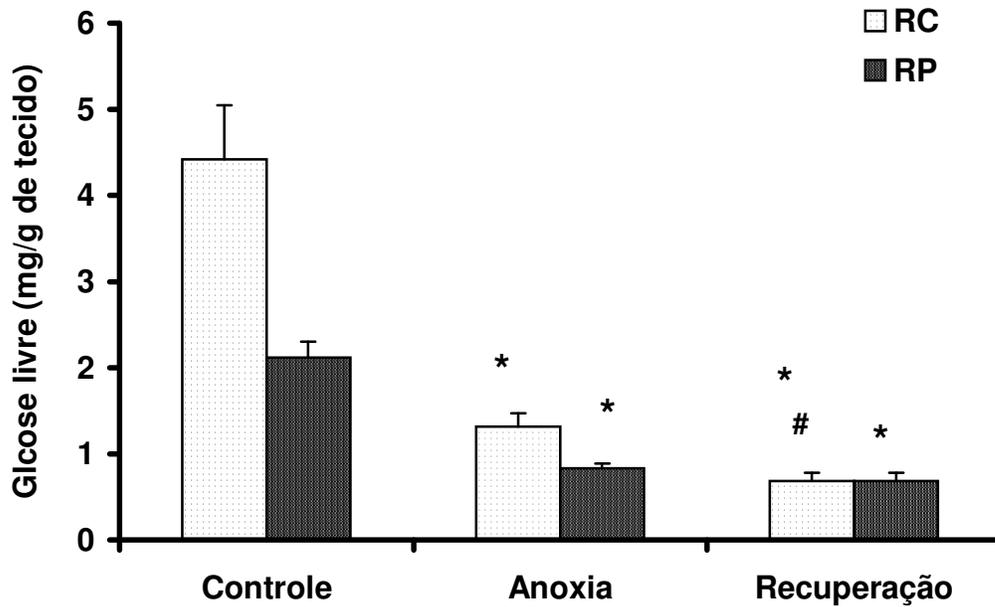
A formação de adenosina trifosfato (ATP) nas BA assim como nas BP do caranguejo *C. granulata*, está representada na figura 4. Nos animais alimentados com dieta RP, observa-se um aumento significativo de 118% nos níveis de ATP após a anoxia, sendo que estes valores mantiveram-se constantes na BA durante a recuperação aeróbica (fig. 4A). Com dieta RC os níveis de ATP nas BA não apresentaram alterações significativas. Apenas nas BP, os níveis de ATP reduziram significativamente na anoxia, mantendo-se constantes durante a recuperação aeróbica. Entretanto, nas BP (fig. 4B) os níveis de ATP não variaram

significativamente, porém, observa-se uma redução de 17% no grupo anoxia e um aumento de 18% na recuperação da anoxia, em relação ao grupo controle.

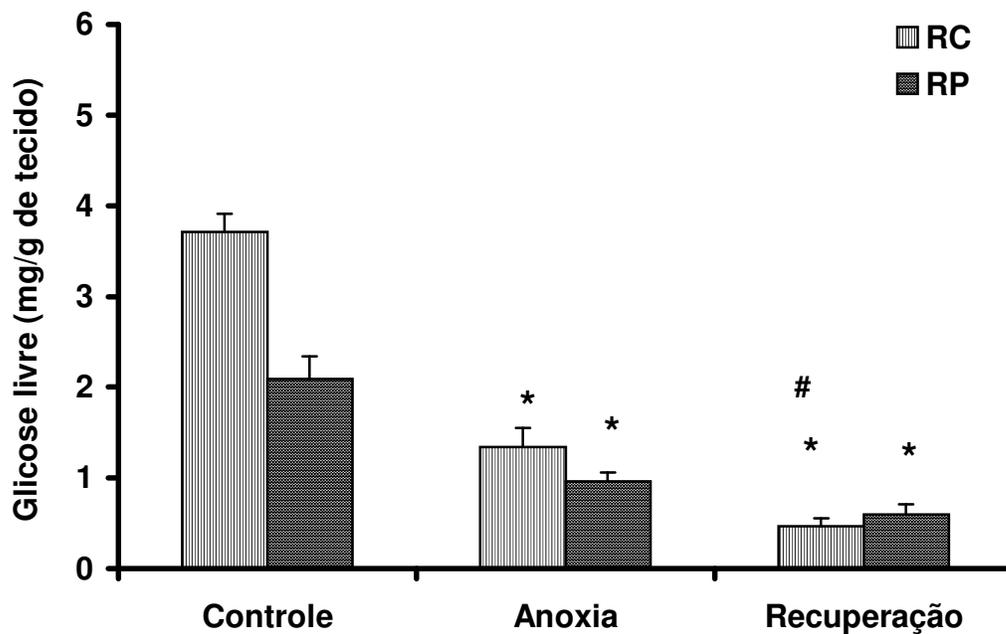


**Figura 1** - Determinação dos níveis glicêmicos na hemolinfa do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1 h) e a recuperação aeróbia (3 h) após a anoxia. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 9 - 14$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle,  $p<0,05$ ; (#) diferença significativa em relação ao período de anoxia ( $p<0,05$ ).

A.

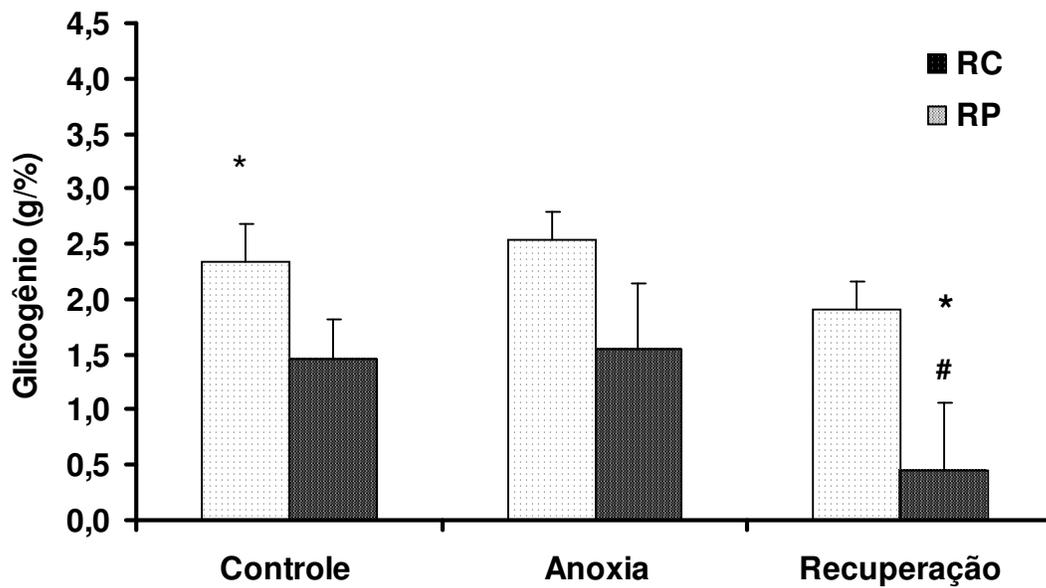


B.

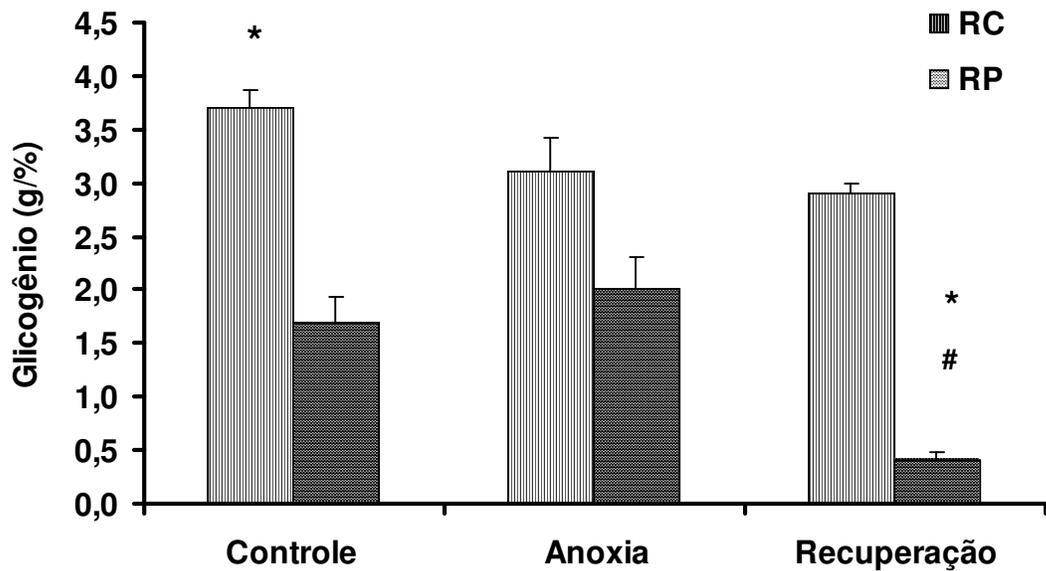


**Figura 2** - Determinação dos níveis de Glicose Livre nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1 h) e a recuperação aeróbia (3 h) após a anoxia. **A.** Brânquias anteriores. **B.** Brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 5 - 6$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle,  $p<0,05$ ; (#) diferença significativa em relação ao período de anoxia ( $p<0,05$ ).

A.

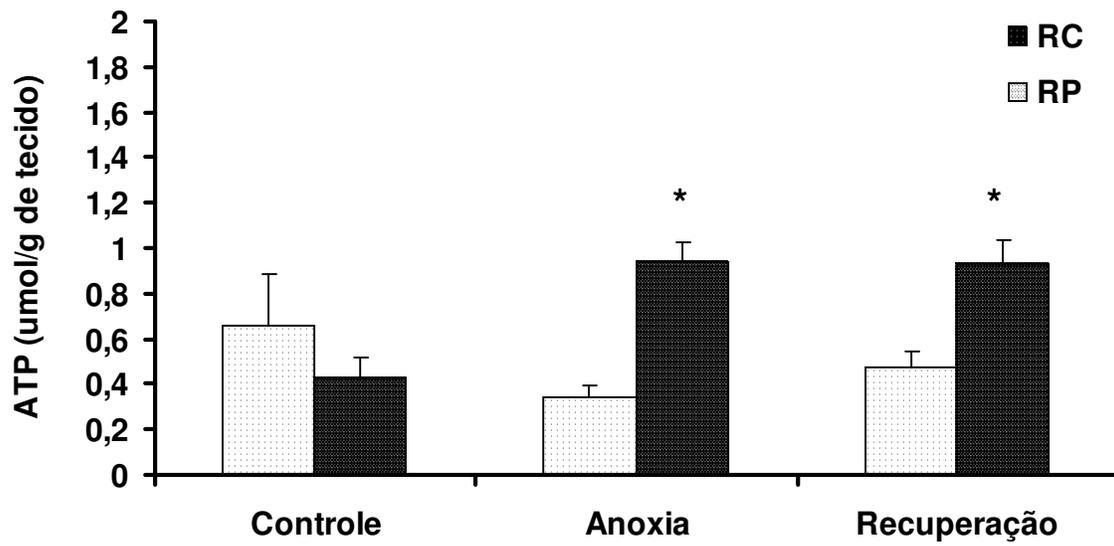


B.

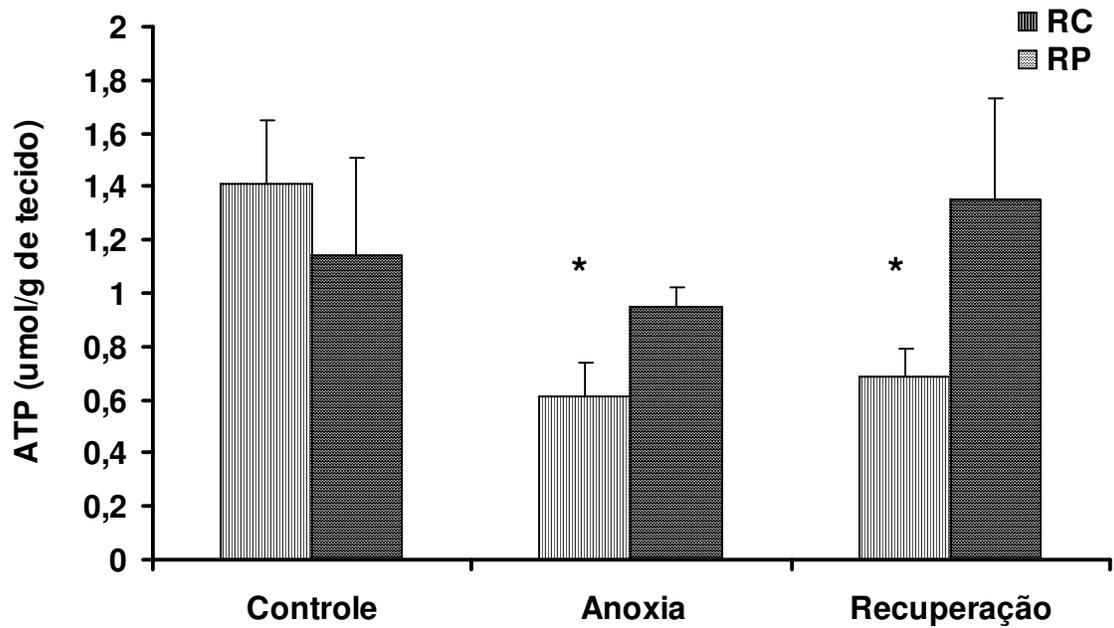


**Figura 3** - Determinação dos níveis de glicogênio nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1 h) e a recuperação aeróbia (3 h) após a anoxia. **A.** Brânquias anteriores. **B.** Brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n=6$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle,  $p<0,05$ ; (#) diferença significativa em relação ao período de anoxia ( $p<0,05$ ).

A.



B.



**Figura 4** - Determinação da formação de ATP nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1h) e a recuperação aeróbia (3 h) após a anoxia. **A.** Brânquias anteriores. **B.** Brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 3 - 4$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle ( $p<0,05$ ).

## DISCUSSÃO

A importância da composição da dieta sobre a regulação das reservas de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*, assim como maiores níveis de glicose na hemolinfa e concentrações de glicogênio no hepatopâncreas de animais alimentados com dieta rica em carboidratos (Kucharski e Da Silva, 1991b; Schein, 1999; Marqueze, 2004). Os resultados obtidos por esses autores são semelhantes aos encontrados nesse estudo, onde caranguejos alimentados com a dieta RC apresentaram níveis de glicose na hemolinfa, glicose livre e concentração de glicogênio nas brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) maiores do que aqueles alimentados com a dieta RP.

A glicose é o principal substrato energético em crustáceos, sendo a principal hexose na hemolinfa desses animais (Herreid e Full, 1988; Morris e Airries, 1998). Sedlmeier e Keller (1981) observaram que o hepatopâncreas de *Orconectes limosus*, apresentou uma redução na concentração de glicogênio e na incorporação de [<sup>14</sup>C]glicose em glicogênio após incubação com CHH. Em *C. granulata* a captação de [<sup>14</sup>C]deoxi-D-glicose no hepatopâncreas também reduziu após quatro horas de anoxia em animais alimentados com dieta RC e oito horas de anoxia em caranguejos alimentados com dieta RP, mantendo-se reduzidos no período de recuperação aeróbica (Oliveira e cols., 2001).

Estudos em *Orconectes limosus* demonstraram um aumento da concentração de lactato após duas horas de exposição ao ar atmosférico. Animais apedunculados, mas que haviam recebido injeções de CHH, apresentaram aumento significativo da glicose hemolinfática em *O. limonus* e em *C. maenas* quando submersos e expostos ao ar (Santos e Keller, 1993). Oliveira e cols. (2001) observou em caranguejos *C.*

*granulata* um aumento significativo da glicose hemolinfática com 2 horas de anoxia tanto em animais alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) como em rica em proteínas (RP). Resultados semelhantes aos encontrados nesse estudo, pois animais alimentados com dieta RC ou RP apresentaram um aumento significativo dos níveis de glicose hemolinfática após uma hora de exposição á anoxia. No entanto a concentração de glicose livre nas brânquias anteriores e nas brânquias posteriores, de caranguejos alimentados com dieta RC ou RP, reduziu significativamente após uma hora de anoxia, permanecendo reduzida após 3 horas de recuperação aeróbica.

Está descrito na literatura que além da concentração/manutenção dos substratos energéticos, existem estratégias de conservação de energia que são “acionadas” no momento em que o animal é submetido a períodos de hipoxia ou anoxia. A resposta inicial da transição entre a normoxia para a hipoxia levaria a ativação da glicólise, seguida de depressão do metabolismo (Lutz e Nilsson, 1997). Estudos realizados em cérebro de tartaruga, *Trachemys scripta*, demonstraram que a sobrevivência a anoxia se dá devido a uma severa depressão metabólica, onde a necessidade energética é mantida somente pela glicólise anaeróbica (Lutz e Kabler, 1997). Marqueze (2004) observou que caranguejos *C. granulata* alimentados com dieta RP apresentaram um aumento significativo da atividade da piruvato kinase (PK) e da produção de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir do  $^{14}\text{C}$ -lactato e  $^{14}\text{C}$ -glicose após uma hora de exposição a anoxia, com aumento significativo nos níveis de ATP no músculo mandibular.

As brânquias anteriores, que têm principalmente função respiratória, apresentaram um aumento significativo nos níveis de ATP e redução significativa dos níveis de glicose livre em caranguejos alimentados com dieta RP e expostos a

anoxia, sendo que estes valores foram mantidos após a recuperação aeróbica. Estes resultados sugerem que as brânquias anteriores estariam utilizando glicose para manutenção de seu metabolismo durante a anoxia e o glicogênio como substrato energético no processo de reoxigenação, uma vez que a concentração do glicogênio, na respectiva dieta (RP) apresentou redução significativa após a recuperação aeróbica. Oliveira e cols. (2001) sugere que a sobrevivência á anaerobiose no *C. granulata*, assim como no isopoda *Stenasellus virei* (Hervant e cols., 1997), se dá devido a utilização da fermentação dos aminoácidos e do glicogênio para a produção de ATP. O aumento da atividade da via gliconeogênica no hepatopâncreas de *C. granulata* submetido a oito horas de anoxia foi observado por Oliveira e cols. (2004), onde houve um aumento significativo na atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) mitocondrial em caranguejos alimentados com dieta RP.

A enzima PEPCK compete com a PK por seu substrato comum, e a razão da atividade da PEPCK e da PK é um bom indicador para a capacidade de produção de energia anaeróbica pela via do succinato (Urich, 1994). A partir dos resultados da atividade da PK obtidos por Marqueze (2004) e da extrapolação dos resultados de PEPCK (Oliveira e cols., 2004) podemos observar que os caranguejos *C. granulata* apresentam uma boa tolerância à anoxia. Comparativamente, os animais alimentados com dieta RP apresentaram uma relação PK/PEPCK maior que aqueles alimentados com a dieta RC. Este fato é evidenciado nas brânquias anteriores de animais alimentados com a dieta RP, onde se observa um aumento de 118% nos níveis de ATP durante a anoxia, ao passo que nos animais alimentados com dieta RC não foram observadas alterações significativas.

As brânquias posteriores, que são principalmente osmorreguladoras (Péqueux

e Gilles, 1988; Trausch e cols., 1989), usariam suas próprias reservas de carboidratos como fonte energética quando submetidos a anoxia, visto que os caranguejos alimentados com as dietas RP ou RC apresentaram uma redução nos níveis de glicose livre na anoxia e na recuperação aeróbica. Mas, assim como nas brânquias anteriores, houve redução da concentração do glicogênio na recuperação aeróbica em caranguejos alimentados com dieta RP. No entanto, os níveis de ATP reduziram na anoxia, e se restabeleceram na recuperação aeróbica, atingindo valores de ATP semelhantes ao grupo controle.

As brânquias posteriores de caranguejos alimentados com a dieta RC, apresentaram uma redução significativa dos níveis de ATP, em ambos os grupos experimentais (anoxia e recuperação da anoxia), sem redução da concentração de glicogênio. Marqueze (2004) observou que caranguejos *C. granulata* alimentados com dieta RC e submetidos a uma hora de anoxia, apresentaram redução na concentração de ATP e na concentração do glicogênio no hepatopâncreas (Oliveira e cols., 2001). No entanto, a atividade da hexoquinase (HK) aumentou significativamente. Este dado sugere o favorecimento da produção local de glicose para o metabolismo anaeróbico (Devlin, 2003), pois os crustáceos apresentam um sistema de circulação aberta, caracterizado por baixo fluxo e pressão, o que dificultaria a regulação da distribuição da hemolinfa nos diferentes tecidos (Schmidt-Nielsen, 1983). Nery (1990) sugeriu a necessidade de um “órgão” que apresentasse a função de estoque e fornecimento central de carboidratos, onde o hepatopâncreas e o músculo (Passano, 1960; Vonk, 1960 apud Schmitt e Santos, 1993) teriam tal característica. Segundo Oliveira e Da Silva (2000), o hepatopâncreas, além de ser considerado como um local de liberação de glicose durante situações de estresse osmótico, anoxia, jejum e variação sazonal, apresenta características funcionais

importantes: armazenamento de lipídios e glicogênio, secreção de enzimas digestivas e capacidade para a via gliconeogênica. Tais características, no animal como um todo, mantêm uma associação e cooperação com outros tecidos para a manutenção da homeostase ao longo do estresse.

O período de recuperação possui grande importância para restauração das reservas energéticas, com exceção das concentrações de glicogênio (Hervant e cols., 1997), onde o acúmulo dos produtos finais do metabolismo anaeróbico são removidos. Acredita-se que nas primeiras horas de recuperação teríamos um aumento da oxidação do lactato (lactato – piruvato - acetil-coa - Ciclo de krebs) e tardiamente um restabelecimento das reservas de glicogênio (Oliveira e cols., 2001; Marqueze, 2004). Marqueze (2004) observou que três horas de recuperação, levou a um aumento da atividade da PK com aumento da oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com dieta RC. Estes dados podem justificar os resultados encontrados no presente estudo onde observa-se que a concentração de glicose hemolinfática, retornam aos valores do grupo controle após três horas de recuperação aeróbica. Contudo, os valores de glicose livre no tecido branquial mantiveram-se reduzidos, sugerindo que as reservas de glicogênio e a oxidação da glicose seriam vias para suplementação energética na recuperação aeróbica em caranguejos alimentados com dieta RC.

Os animais alimentados com dieta RP apresentam maior atividade da via gliconeogênica a partir do  $^{14}\text{C}$ -lactato após 12 h de recuperação (Oliveira e cols., 2004). Marqueze (2004) observou que a atividade da PK e as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas mantiveram-se reduzidos após três horas de recuperação em caranguejos alimentados com dieta RP, assim como obserados nas brânquias anteriores e posteriores no presente estudo. A concentração de glicose na

hemolinfa em caranguejos alimentados com dieta RP apresentaram redução significativa após três horas de recuperação. Estes resultados sugerem que a via gliconeogênica em alguns tecidos, o uso dos ácidos graxos e concentrações de arginina fosfato seriam uma forma de suplementação energética utilizada na recuperação aeróbica (Marqueze, 2004; Oliveira e cols., 2004; Hervant e cols., 1997; Morris e Adamczewska, 2002) bem como na ativação de processos endergônicos que levariam a uma redução dos níveis de glicose hemolinfática (Oliveira e cols., 2001).

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, sugere-se que, dependendo do tecido analisado e da composição da dieta administrada, diferentes ajustes metabólicos podem ser observados no caranguejo *C. granulata* submetidos à anoxia e à recuperação da anoxia. Para melhor entendimento do metabolismo energético nesta espécie, seriam necessários estudos posteriores visando a determinação da concentração da arginina fosfato durante os ajustes metabólicos ao estresse anóxico e à recuperação aeróbica.

## BIBLIOGRAFIA

- Beis, I., Newsholme, E.A. 1975. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J.*, 152, 23-32.
- Bond-Buckup, G.; Fontoura, N.f.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C. 1991. O Caranguejo: Manual para o ensino prático em zoologia; POA; Editora da Universidade/UFRGS.
- Boschi, E.E. 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)*, 6, 1-76.
- Carr, R.S.; Neff, J.M. 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B (3) 447-449.
- Childress J.J., Seidel B.A. 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J. Exp. Biol.* 201, 1223-1232.
- Cooper, A.W. 1974. Salt Marshes. In: Odum, H., Copeland B. J., Macmahon E. A. (eds) *Coastal Ecological Systems of United States*. The conservation Foundation, Washinton D. C., V II, 55-98.
- Devlin T.M. 2003. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 5ª edição, Edgard Blücher Ltda., SP, 1084p.
- England, w.R.; Baldwin, J., 1983. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behaviour. *Physiol. Zool.*, 56, 614-622.
- Geary, N.; Langhans, W.; Scharrer, E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.*, 241(10): R330-335.
- Hartnoll, R.G. 1988. Evolution, systematics and Geographical Distribution. In: Burggren, W. and McMahon, B (eds). *Biology of Land Crabs*. Cambridge Univesity Press, New York. pp. 6-54
- Herreid, C.F., Full, R.J. 1988. Energetics and locomotion. Pp. 333-377. In: Burggren, W.W., McMahan, B.R. (eds.). *Biology of the land crabs*. Cambridge Universty Press: Combridge.
- Hervant F., Mathieu J., Garin D., Fréminet A. 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol. Zool.*, 68, 223-244.
- Hervant F., Mathieu J., Messana, G. 1997. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe

- hypoxia and subsequent recovery. C. R. Seances Acad. Sci. Ser. III Sci Vie 320, 139-148.
- Hiil, A.D.; Taylor, A.C.; Strang, R.H.C. 1991b. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maemas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 150, 31-50.
- Hochachka P.W., Somero G.N. 1984. Biochemical Adaptation. Princeton University Press, New Jersey. 538 p.
- 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. A99, 215-218.
- Lutz, P.L.; Kabler, S. 1997. Release of adenosine and ATP in the brain of the freshwater turtle (*Trachemys scripta*) during long-term anoxia. Brain Research, 769, 281-286.
- Lutz, P.L.; Nilsson, G.E. 1997. Contrasting strategies for oxic brain survival-glycolysis up or down. J. Experim. Biolo., 200, 411-419.
- Mañe-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, A33 (86), 163-171.
- Marqueze, A. 2004. Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulata* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- 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.
- Morris S., Adamczewska, A. 2002. Utilization of glycogen, ATP, and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. Comp. Biochem. Physiol., A133, 813-825.
- Morris, S., Airriess, C.N. 1998. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. S. Afr. J. Zool., 33, 87-10.
- Nery, L.E.M. 1990. Efeito da salinidade no metabolismo de carboidratos de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda). Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande. Furgs, Rio Grande, Brasil.
- Odum, E.P. 1985. Ecologia. Interamericana, Ed. Rio de Janeiro, 435p.
- Oliveira, G.T. 1998. Estudo do metabolismo de carboidratos em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou

- proteínas; POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. Mar. Biol., 139, 335-342.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S. M. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp. Biochem. Physiol., B127, 375-381.
- Oliveira, G.T., Eicheler, P., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. J. Exp. Zool., A 301, 240-248.
- Péqueux, A.; 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., pp. 2-47.
- Pothin H.S. 1999. Alterações metabólicas e enzimáticas induzidas por peróxido de hidrogênio ou isquemia-reperfusão no coração isolado de rato. POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- Santos, E.A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G. C. 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Comp. Biochem. Physiol., A88, 21-25.
- Santos, E.A.; Keller, R. 1993. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentration in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). Comp. Biochem. Physiol., A106 (2), 343-347.
- Santos, E.A.; Nery, L.E. M.; Manzone, G.C. 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, rapsidade). Comp. Biochem. Physiol. A89, 329-332.
- Schein, V. 1999. Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. POA, Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Schmitt, A.S.C.; Santos, E.A. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda) during emersion. Comp. Biochem. Physiol. A106 (2), 329-336.
- Sedlmeier, D.; Keller, R. 1981. The mode of action of the crustacean neurosecretory

- hyperglycemic hormone. I. Involvement of cyclic nucleotides. *Gen. Comp. Endocr.*; 45, 82-90.
- Speed, S.R.; Baldwin, J.; Wong, R.J.; Wells, R.M.G. 2001. Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster, *Jasus edwardsii*, and responses to emersion during simulated live transport. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B, 435-444.
- Traush, G.M.; Forget, Cl.; Devos, P. 1989. Bioamines-stimulated phosphorylation and (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B (3), 487-492.
- Turcato, G.S. 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas-Zoologia) Instituto de Biociências.
- Urich, K. 1994. Comparative animal biochemistry. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. *Anal. Biochem.* 11, 226-265.
- Vinagre, A.P., 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, 579-583.

## **ARTIGO II**

**Efeito da anoxia e da recuperação da anoxia sobre a síntese  
protéica no caranguejo *Chasmagnathus granulata* alimentado com  
dieta rica em carboidratos ou proteínas**

Autores: **Letícia S. dos Santos**, Luiz Carlos Kucharski

**Porto Alegre, dezembro de 2004**

## Resumo

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinhos e límnicos. Esses ecossistemas sofrem a influência de fatores como as marés e as precipitações, impondo a sua biota um elevado estresse ambiental. O estresse pode ser gerado tanto pelas variações de fatores como a salinidade, a temperatura bem como pela quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido no ambiente. A redução do metabolismo em animais tolerantes a anoxia ocorre para a manutenção da atividade celular e com baixo consumo de ATP. Estudos demonstraram que no fígado, coração e músculo da carpa *Carassius carassius* ocorre redução da síntese protéica sugerindo ser esta a estratégia de conservação de energia. Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de síntese protéica no hepatopâncreas, músculo e brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) do caranguejo *Chasmagnathus granulata* submetidos a anóxia e a recuperação da anoxia após serem alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP).

Os resultados obtidos demonstram que a síntese de proteínas no hepatopâncreas reduziu significativamente na anóxia (78%) e na recuperação (65%) em caranguejos alimentados com dieta RP. Em animais alimentados com dieta RC, a síntese protéica aumentou 42% na recuperação. A síntese de proteínas no músculo de animais alimentados com dieta RC aumentou 213% ( $p < 0,05$ ) na anoxia e reduziu 12% na recuperação aeróbica. Nas brânquias anteriores houve redução significativa de 57% na síntese protéica, enquanto nas brânquias posteriores a redução foi de 36% da síntese protéica na anoxia em caranguejos alimentados com dieta RP. Na dieta RC, ocorreu um aumento de 13% da síntese protéica nas BA e 8% nas BP, na recuperação aeróbica.

Os resultados obtidos sugerem que a síntese protéica durante a anoxia e durante a recuperação nos diferentes tecidos, está relacionada com a característica funcional e a capacidade metabólica de cada tecido, independente da dieta administrada.

**Palavras chave:** alanina, anoxia, caranguejos, glicose, metabolismo, síntese de proteína, recuperação aeróbica.

## INTRODUÇÃO

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-as a tolerar as alterações freqüentes das características, físico-químico do meio. A adaptação a este ambiente terrestre pode ser observada em diversos grupos de crustáceos (Pawers e Bliss, 1983 apud Schmitt e Santos, 1993).

O caranguejo *C. granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) ocupa preferencialmente os pisos supra e mesolitorâneos, onde abrem galerias ou tocas com profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático fazendo sempre com que haja água no fundo das tocas. O teor de oxigênio dissolvido na água varia de 2,78 mgO<sub>2</sub>/L até 11,78 mgO<sub>2</sub>/L. Nos meses de inverno, os níveis de O<sub>2</sub> dissolvido nas tocas subterrâneas atingem valores muito próximos de zero apresentando uma redução do período de atividade dos animais, que permanecem por mais tempo em suas tocas ou galerias (Turcato, 1990).

Estudo realizado em *Chasmagnathus granulata* demonstrou que a composição da dieta oferecida aos animais, diferencia o padrão de resposta do metabolismo de carboidratos, com diferenças nas concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo (Kucharski e Da Silva, 1991b). Oliveira (1998) observou um aumento na atividade da enzima chave para a gliconeogênese a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), fração mitocondrial após 8 horas de anoxia no hepatopâncreas de caranguejos *C. granulata* alimentados com dieta RP. Marqueze (2004) verificou que a anoxia promoveu uma redução das concentrações de ATP,

glicogênio e atividade da piruvato quinase (PK) no hepatopâncreas de *C. granulata* alimentados com dieta RP ou RC. Entretanto a hexoquinase (HK) aumentou somente nos animais alimentados com dieta RC. Variações na produção de energia durante o exercício também foram observadas; em três espécies de crustáceos decapodas: *Callinectes sapidus*, *Cardisoma guanhumi* e *Gecarcinus lateralis* (Henry e cols., 1994).

Hervant e cols. (1995) em um estudo comparativo da sobrevivência à hipoxia entre duas espécies de crustáceos (*Niphargus rhenohodamensis* e *Gammarus fossarum*) constatou que a diferença na capacidade de tolerância a anoxia estaria associada ao tipo de habitat de cada espécie estudada, assim como pelas elevadas concentrações de glicogênio e arginina fosfato. A redução do metabolismo em animais com tolerância a anoxia seria a hipótese esperada devido a necessidade de manutenção da atividade celular com baixo consumo de ATP. Da mesma forma foi observado que a síntese proteica, processo que gera consumo de energia também deveria estar reduzido.

Estudos demonstraram que no coração, fígado e músculo da carpa *Carassius carassius* ocorre redução significativa da síntese protéica, entretanto no cérebro não houve a mesma resposta metabólica, sugerindo ser esta uma das estratégias de conservação de energia (Smith e cols., 1996).

Lyndon e Houlihan (1998), em sua revisão sobre a renovação de proteínas em brânquias de peixes e crustáceos, demonstraram que o tecido branquial é o mais ativo em termos de síntese de proteínas, seguido pelo fígado, o hepatopâncreas, músculo e coração. O estudo sugere que o tecido branquial apresenta um elevado grau de plasticidade do metabolismo protéico, mesmo em condições adversas, o que assegura a manutenção da integridade das funções branquiais, as quais tem grande

importância para a sobrevivência do animal. Resultados semelhantes foram encontrados por Schein (1999), onde os valores de síntese protéica nas brânquias, de caranguejos *C. granulata* submetidos ao estresse hiperosmótico, apresentaram 100 vezes mais capacidade de síntese protéica, que aqueles obtidos no hepatopâncreas e no músculo.

Baseado nestas evidências o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito da dieta rica em carboidratos (arroz cozido) ou proteínas (carne crua bovina) sobre a capacidade de síntese protéica em diferentes tecidos do caranguejo *C. granulata* submetidos a anóxia e a recuperação da anoxia.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta e manutenção dos animais**

A coleta dos caranguejos *C. granulata*, utilizados no presente estudo foi realizada na Lagoa de Tramandaí, município de Imbé no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, com permissão das autoridades do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA – nº 332/90). Os animais foram capturados no sedimento areno-lodoso, na água e nas tocas e colocados em caixas plásticas com água do próprio local para o transporte até o Laboratório.

No laboratório os caranguejos machos foram submetidos a dois tratamentos: dieta rica em proteínas (carne crua bovina) ou rica em carboidratos (arroz cozido) alimentados *ad libitum*, diariamente ao final da tarde. Durante os 15 dias de aclimatação às dietas, os animais foram mantidos em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo natural e aeração constante.

Após o período de aclimação às dietas, os animais foram colocados em um aquário onde o oxigênio foi substituído por gás nitrogênio (AGA - American Gás Association) e gaseificado por 40 minutos, para que a PO<sub>2</sub> atingisse 0% (monitorado com um oxímetro Oxel-I/ISO2). Passados 40 minutos de gaseificação com gás nitrogênio (N<sub>2</sub>), o aquário foi lacrado com filme plástico e os animais foram submetidos a uma hora de anoxia. Após o período experimental parte dos animais foi retirada e submetida a três horas de recuperação da anoxia (reoxigenação) em aquário aerado com salinidade de 20‰ (Oliveira e cols., 2001).

Os animais do grupo controle (C) permaneceram em condições aeróbicas.

Após o período experimental, os animais foram crioanestesiados e amostras de brânquias anteriores (BA), posteriores (BP), hepatopâncreas e músculo da mandíbula foram coletados para realização dos experimentos *in vitro* de síntese protéica conforme método descrito por Richardson e cols. (1997). Os tecidos foram incubados em tubos do tipo eppendorf contendo 500 µL de 300mM de solução fisiológica de crustáceo (SFC) pH 7,8, acrescida de 10 mM HEPES; 0,1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF); 0,2 µCi de L-leucina-U-<sup>14</sup>C (310 mCi/mmol – Amersham) e 5 mM de L-leucina não marcada. Os tubos foram aerados com carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>. 95:5% v/v) e incubados por quatro horas em banho metabólico a 25°C sob agitação constante (Schein, 1999). Após a incubação as amostras foram homogeneizadas, e um volume de 250µL da amostra foi colocado em filtros de microfibras de vidro (GF/B, 24 mm, Whatman). Os filtros foram lavados com TCA 10% por 10 minutos, a seguir os filtros foram lavados duas vezes em álcool 92% e duas vezes em éter. Quando secos, os filtros foram colocados em frascos com líquido de cintilação e a radioatividade quantificada em contador LKB-Wallac. Os resultados foram expressos em µmoles de L-U-leucina-<sup>14</sup>C incorporada em proteínas por mg

proteína tecidual por tempo de incubação.

As proteínas totais (10  $\mu$ L da amostra) foram quantificadas segundo método de Bradford (1976) utilizando-se albumina bovina como padrão.

## **TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). Foi utilizado o teste “t” de Student para dados não pareados entre os grupos controles. Para os grupos experimentais foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via e para os tratamentos alimentares (dietas RC ou RP) foi utilizada análise de variância de duas vias (ANOVA) com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

## RESULTADOS

O efeito da síntese de proteínas no hepatopâncreas no caranguejo *Chasmagnathus granulata*, alimentados com dieta rica em carboidratos (RC) ou proteínas (RP) e submetidos a anoxia e a recuperação aeróbica é mostrado na figura 1.

Nos caranguejos alimentados com dieta rica em proteínas (RP) houve uma redução significativa da síntese de proteínas no hepatopâncreas (fig. 1) dos grupos experimentais anoxia e recuperação, em 78% e 65%, respectivamente. Observou-se resultado diferenciado em caranguejos alimentados com dieta rica em carboidratos (RC), onde não houve alteração da síntese protéica no grupo anoxia, mas um aumento de 42%, não significativo, no grupo de recuperação aeróbica.

Os resultados do efeito das dietas RC ou RP sobre a síntese de proteínas no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata* submetidos a anoxia e a recuperação da anoxia, está representado na figura 2. Nos animais alimentados com dieta RC houve um aumento significativo de 213% na síntese de proteínas no grupo anoxia, e redução de 12% na recuperação aeróbica, quando comparado ao grupo controle. Não houve mudança significativa da síntese protéica entre os grupos experimentais alimentados com dieta rica em proteínas.

A comparação do efeito das dietas RC e RP sobre a síntese de proteínas nos diferentes grupos experimentais não mostrou uma diferença significativa nos tecidos hepatopancreático e muscular (fig. 1 e 2).

O efeito da síntese de proteínas em animais alimentados com dieta RC ou RP, submetidos a anoxia e a recuperação da anoxia nas brânquias anteriores (BA) e posteriores (BP) do caranguejo *Chasmagnathus granulata* estão representados na

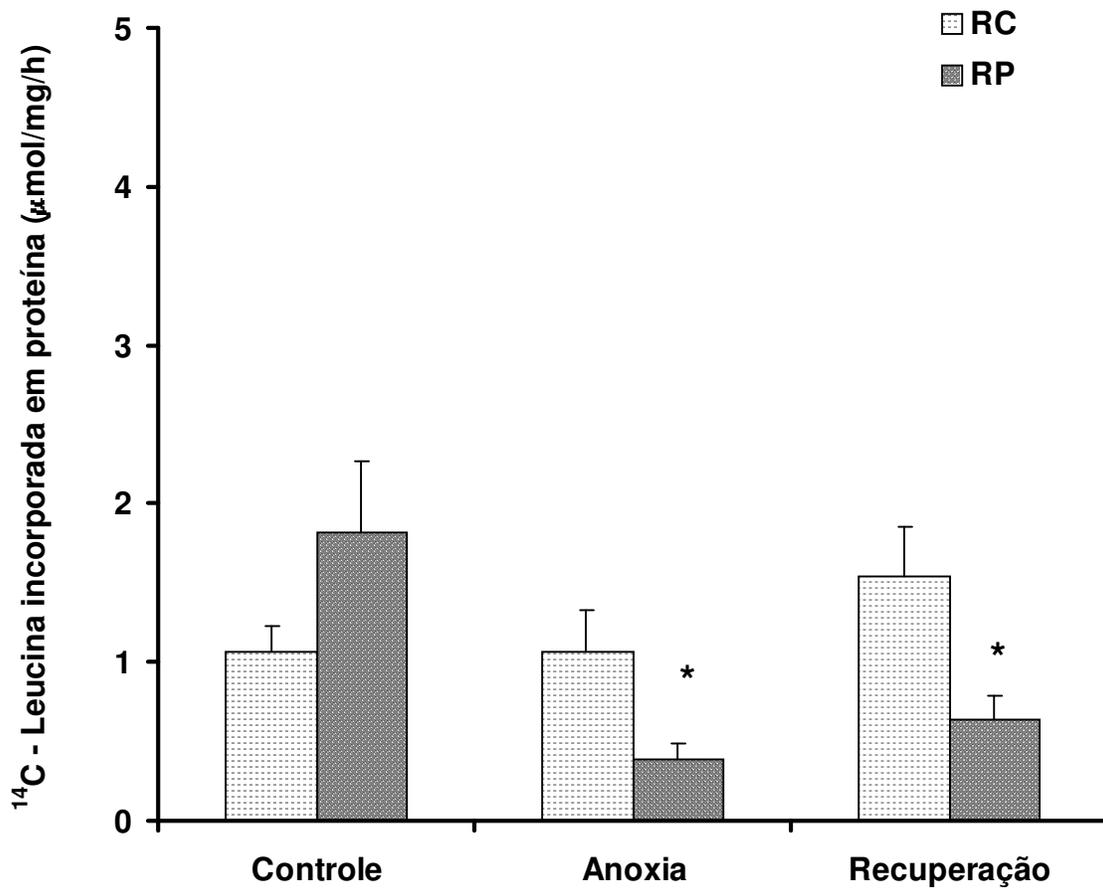
figura 3.

Nas brânquias anteriores de caranguejos alimentados com dieta RP (fig. 3a) houve uma redução significativa da síntese protéica no grupo experimental anoxia. Nas brânquias posteriores (fig. 3b) houve redução da síntese protéica em 36% durante a anoxia retornando os valores semelhantes àqueles do grupo controle na recuperação aeróbica.

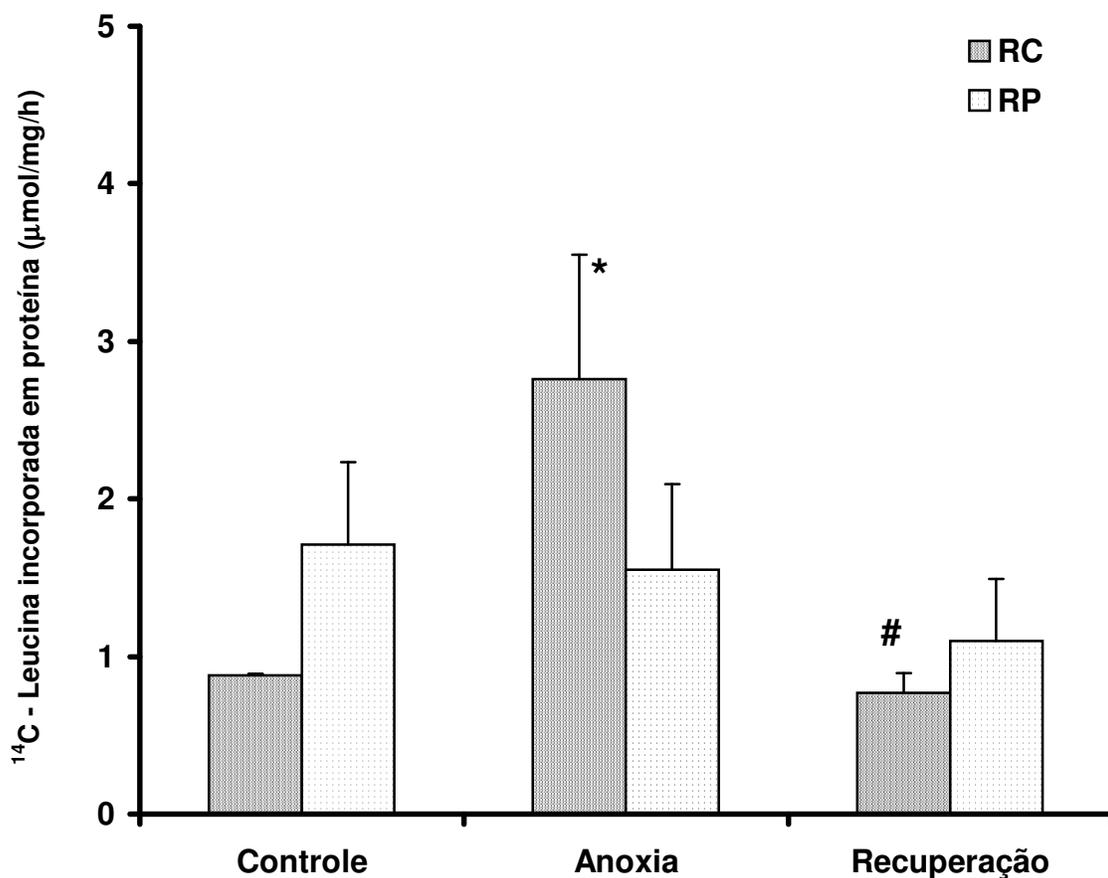
Na dieta RC houve aumento de 13% da síntese protéica na recuperação aeróbica em brânquias anteriores em relação ao grupo controle, mas este aumento não foi estatisticamente significativo. Resultados semelhantes foram encontrados nas brânquias posteriores, entre os grupos experimentais, para animais alimentados com dieta rica em carboidratos.

Observou-se que caranguejos alimentados com dieta RC apresentaram maior capacidade de síntese de proteínas nas brânquias anteriores quando comparados as brânquias posteriores este percentual foi de 28%. Entretanto, nos animais alimentados com dieta RP não foi observado diferença significativa na síntese de proteínas entre as brânquias anteriores e posteriores, como foi observado em animais alimentados com dieta rica em carboidratos.

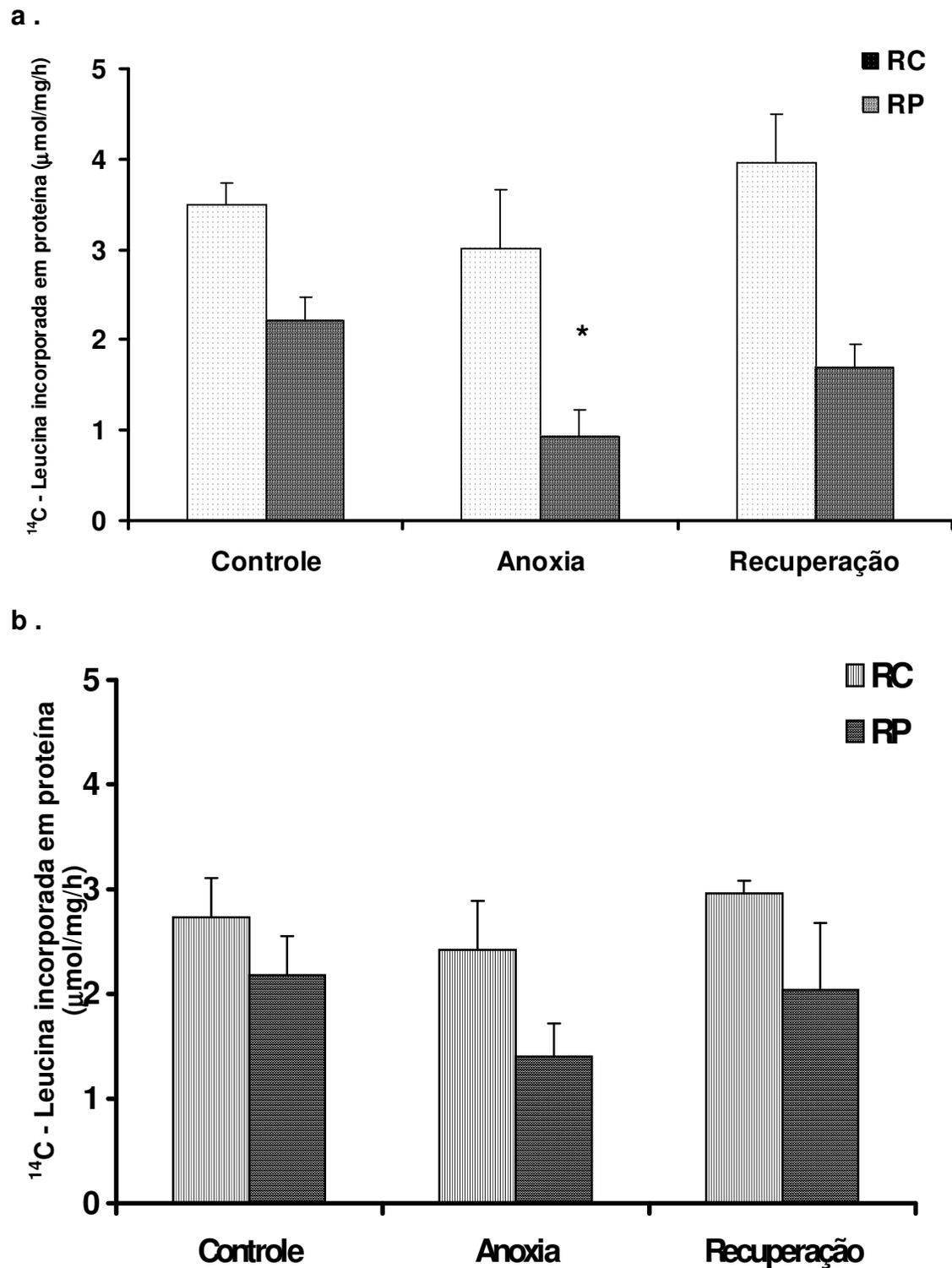
No grupo controle, as brânquias anteriores apresentam *per se* 22% maior capacidade de síntese protéica comparados às brânquias posteriores, mas estes resultados não foram estatisticamente significativos.



**Figura 1** - Determinação da síntese de proteínas no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1h) e a recuperação aeróbia (3h) após a anoxia. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 4 - 5$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle ( $p<0,05$ ).



**Figura 2** - Determinação da síntese de proteínas no músculo da mandíbula do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1h) e a recuperação aeróbia (3h) após a anoxia.. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 4 - 5$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle,  $p<0,05$ ; (#) diferença significativa em relação ao período de anoxia,  $p<0,05$ .



**Figura 3** - Determinação da síntese de proteínas nas brânquias do caranguejo *C. granulata* exposto a anoxia (1h) e a recuperação aeróbia (3h) após a anoxia. **a .** brânquias anteriores. **b .** brânquias posteriores. Os dados estão representados como média  $\pm$  erro padrão,  $n= 4 - 6$ . (\*) diferença significativa em relação ao controle,  $p<0,05$ .

## DISCUSSÃO

Estudos em animais tolerantes a anaerobiose facultativa como a Carpa, (*Carassius carassius*) demonstraram redução da capacidade de síntese protéica no coração, no músculo e no fígado, mas não no cérebro, quando expostos a anoxia (Smith e cols., 1996). No presente trabalho também foi observado no caranguejo *Chasmagnathus granulata*, que a síntese de proteínas reduziu no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores de animais alimentados com dieta RP, não ocorrendo em animais alimentados com dieta RC. Marqueze (2004) e Oliveira (1998) observaram que o conteúdo de glicogênio, assim como a concentração de glicose livre no músculo mandibular é o dobro em caranguejos alimentados com dieta RC. As concentrações de glicose livre e o glicogênio muscular reduziram significativamente após uma hora de anoxia, sugerindo que a composição da dieta pode diferenciar a mobilização das reservas de carboidratos no hepatopâncreas e no músculo de *C. granulata*. Lutz e Nilsson (1997) em uma revisão sobre diferentes estratégias metabólicas encontradas em animais tolerantes a anoxia, referem que a carpa *Carassius carassius* quando submetido a anoxia as estratégias encontradas são: o aumento da via glicolítica (estratégia glicolítica) para fornecimento da energia necessária (ATP) com excreção de etanol produzido a partir do lactato (produto anaeróbico final) e redução do metabolismo.

Hervant e cols. (1996) assim como Hochachka e Lutz (2001) demonstraram que a tolerância a hipoxia/anoxia está diretamente relacionada com capacidade de regulação, armazenamento e utilização do glicogênio tecidual. O glicogênio hepatopâncreático nos animais alimentados com dieta RC é maior do que nos animais alimentados com dieta RP (Kucharski e Da Silva, 1991b; Oliveira, 1998;

Marqueze, 2004). Resultados encontrados por Oliveira e cols. (2001) demonstraram que a atividade da enzima glicogênio fosforilase (GP<sub>a</sub>) é maior em animais adaptados à dieta RC, sugerindo que animais alimentados com esta dieta poderiam tolerar melhor a anoxia. Esta seria a hipótese encontrada para justificar que a capacidade de síntese protéica nos diferentes tecidos pode ser mantida em animais alimentados com dieta RC. Esta pode ser uma das estratégias encontrada para a “economia” de aminoácidos que posteriormente poderiam ser utilizados na via gliconeogênica (Oliveira e Da Silva, 2000).

O hepatopâncreas, além de ser considerado como um local de armazenamento e de liberação de glicose, apresenta características funcionais importantes: armazenamento de lipídios e glicogênio, secreção de enzimas digestivas e grande capacidade para a via gliconeogênica (Oliveira e Da Silva, 2000). Quantitativamente o aminoácido mais importante para a via gliconeogênica em vertebrados é a alanina. A utilização de aminoácidos pelos crustáceos é favorecida pois estes animais apresentam dez vezes mais aminoácidos do que nos tecidos dos mamíferos (Huggins e Munday, 1968; Gilles, 1987). Estudos de Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram que *C. granulata* alimentados com a dieta RP apresentaram maior concentração de uréia na hemolinfa e maior capacidade gliconeogênica a partir de <sup>14</sup>C-alanina pelo hepatopâncreas durante o choque hiposmótico de 72 horas. Também foi observado que em *C. granulata*, o hepatopâncreas de animais alimentados com dieta RP, apresentou maior atividade da enzima chave da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) mitocondrial após oito horas de anoxia (Oliveira e cols., 2004).

Outro aspecto que deve ser levado em consideração, é que a síntese de proteínas é um processo que exige dos organismos um gasto de energia. Em

animais expostos a anoxia, a síntese de proteínas deveria estar reduzida ou suprimida, sendo uma das estratégias de conservação de energia (Fraser e cols., 2001; Hochachka e cols., 1996).

Outra via que demanda um gasto de ATP é a gliconeogênese a qual pode utilizar o piruvato como substrato (Urich, 1994). Outra possibilidade de metabolização do ácido láctico é a presença de oxigênio, se isto não ocorrer o ácido láctico volta a formar piruvato (Hill e cols., 2004).

Entretanto os resultados encontrados no presente trabalho com relação à redução da síntese protéica no hepatopâncreas nos caranguejos alimentados com dieta RP, não foram os mesmos resultados encontrados por Schein (1999). O autor sugere que o hepatopâncreas atue como um importante sítio de produção de compostos nitrogenados independentemente da dieta oferecida. Marqueze (2004) verificou que o pH da hemolinfa de animais alimentados com dieta RP foi significativamente maior do que animais alimentados com dieta RC; sugerindo ser este um mecanismo compensatório devido ao catabolismo de aminoácidos essenciais para fornecimento de energia. Também ocorre aumento na concentração de amônia na hemolinfa, como foi observado por Rosas e cols. (2002) em *Litopenaenus vannamei* alimentados com dieta rica em proteínas.

Marqueze (2004) estudando a via glicolítica no tecido hepatopancreático do caranguejo *C. granulata* alimentados com dieta RC, verificou um aumento da atividade da piruvato quinase (PK) de 50% quando comparados aos animais alimentados com dieta RP. Em mamíferos a dieta rica em carboidratos resulta na elevação da atividade da PK no fígado e no tecido adiposo, com aumento da concentração de piruvato (Brito e cols, 2001).

O oxalacetato é convertido a fosfoenolpiruvato (PEP) e após a piruvato, reação

catalizada pelas enzimas, Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e a piruvato quinase (PK) respectivamente. Este piruvato formado pode seguir duas vias: transportado para as mitocôndrias e ser convertido à acetil-Coa e então ser completamente oxidada no ciclo de Krebs ou pode ser transaminado à alanina na reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase. Assim, este piruvato produzido a partir da glicose pode formar alanina no músculo (Newsholme-Leech,1983).

Os resultados de Marqueze (2004) mostram que as reservas de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo reduzem 34% e 70% nos animais RC, respectivamente. Estes resultados indicam que o tecido muscular pode acumular piruvato.

Schein (1999) em estudo com caranguejos alimentados com dieta RP submetidos ao estresse hiperosmótico, demonstrou que a síntese de proteínas, no músculo mandibular, aumentou às 72 horas de estresse. Entretanto, conforme os resultados encontrados no presente trabalho observou-se que nos animais alimentados com dieta RC a síntese de proteínas aumentou após uma hora de anoxia, não ocorrendo em animais alimentados com dieta RP. Em *C. carassius*, a síntese de proteínas foi significativamente reduzida somente no músculo branco e vermelho, coração e no fígado (Fraser e cols., 2001) após 48 horas de anoxia.

Também podemos observar que os níveis de ATP muscular de animais alimentados com dieta RC estão reduzidos (Marqueze, 2004). Assim a hipótese é que provavelmente o tecido muscular de animais alimentados com dieta RC, estaria usando a alanina, sintetizada a partir do piruvato, para realizar a síntese protéica. No entanto durante a reoxigenação se observa uma redução da síntese protéica em ambas as dietas, provavelmente com o objetivo de resturar as reservas energéticas

através da oxidação do lactato – piruvato ou oxidação dos aminoácidos. Entretanto estudos posteriores, para se verificar esta hipótese no caranguejo serão necessários.

No presente trabalho, a síntese protéica em animais controle no tecido branquial foi de três vezes maior aproximadamente, em relação aos valores encontrados no hepatopâncreas e no músculo da mandíbula do caranguejo *C. granulata*. Resultados semelhantes foram encontrados por Schein (1999) em relação à capacidade de síntese protéica branquial comparada aos demais tecidos.

Estudos realizados com crustáceos eurialinos, incluindo investigação estrutural do epitélio branquial (Trausch e cols., 1989), demonstraram que as brânquias apresentam diferenças funcionais importantes. As brânquias posteriores têm função osmorreguladoras por possuírem alta atividade da (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase, enquanto que as brânquias anteriores, apresentam importante função respiratória (Péqueux e Gilles, 1988). O tecido branquial representa uma grande superfície exposta ao meio ambiente, devido à função respiratória e osmorregulatória. Assim a síntese protéica seria conservada, mesmo em períodos de condições adversas de temperatura, salinidade ou restrição alimentar (Schein, 1999; Lyndon e Houlinam, 1998) para a manutenção do metabolismo e para a osmorregulação.

As brânquias anteriores de *C. granulata* não apresentam alterações na síntese protéica após 72 horas de choque hipersalino, independente da dieta administrada (Schein, 1999). Já as brânquias posteriores apresentaram um aumento de 60% da capacidade de síntese protéica em animais alimentados com dieta RP. No presente trabalho, a anoxia induziu nas brânquias anteriores, uma redução significativa de 57% na síntese protéica em animais alimentados com dieta RP e uma redução não significativa de 15%, em animais alimentados com dieta RC. Entretanto, nas

brânquias posteriores, tanto de animais alimentados com a dieta RP ou RC, não houve alteração da síntese protéica quando submetidos ao estresse anóxico ou mesmo a reoxigenação. Santos e cols. (2004) observou que no grupo controle foi encontrado, níveis significativamente maiores de glicose livre nas brânquias anteriores comparados com as brânquias posteriores na dieta RC. Mas quando os caranguejos foram submetidos a uma hora de anoxia houve redução significativa somente nos níveis de glicose livre, não observando alterações dos níveis de glicogênio em BA e BP tanto em animais alimentados com dieta RC ou RP (Santos e cols, 2004).

Os resultados encontrados no presente trabalho em relação a síntese protéica no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores retornarem aos níveis próximos do grupo controle na recuperação aeróbica pode ser justificado conforme os resultados encontrados por Brooks e Storey (1993). Os autores sugerem que a recuperação da síntese de proteínas no cérebro e no músculo de tartarugas *Trachemys scripta elegans*, ocorra de forma lenta durante a recuperação aeróbica, pode estar reduzida em função da necessidade de restauração dos substratos energéticos e concentrações de glicogênio nos tecidos que durante o período anóxico foram depletados (Brooks e Storey, 1993).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a capacidade de síntese protéica durante na aoxia e recuperação da anoxia, nos diferentes tecidos, está relacionada principalmente com a característica funcional e com a capacidade metabólica do tecido e parcialmente dependente da dieta administrada. Este fato evidência a característica da personalidade tecidual, onde cada tecido tem um perfil metabólico diferente, para um mesmo tipo de estresse.

## BIBLIOGRAFIA

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brito, S.R.C.; Moura, M.A.F.; Kawashita, N.H.; Brito, M.N.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. 2001. Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism.*, 50, 1208-1212.
- Brooks, S.P.; Storey, K.B. 1993. *De novo* protein synthesis and protein phosphorylation during anoxia and recovery in the red-eared turtle. *Am. J. Physiol.* 265; 380-386.
- Fraser, k.P.P.; Houlihan, D.f.; Lutz, P.L.; Leone-Kabler, S.; Manuel, L.; Brechin, J.G. 2001. Complete suppression of protein synthesis during anoxia with no post-anoxia protein synthesis debt in the red-eared slider turtle *Trachemys scripta elegans*. *J. Experimental Biology*, 204, 4353-4360.
- Gilles, R. 1987. Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. In: Gills, R., Kleinzeller, A., Bolis, L. (Eds.) *Current Topics in Membranes and Transport*. Academic Press, New York, 205-247.
- Henry, R.P., Booth, C.E, Lallier, F., Walsh, P. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.*, 1866, 215-234.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Fréminet, A. 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol. Zool.*, 68, 223-244.
- Hervant F. 1996. The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hypogean and epigean crustaceans. *C. R. Seances Acad. Sci. Ser. III Sci Vie* 319:1071-1077.
- Hill, R.W. 2004. Aerobic and anerobic forms of metabolism. In: Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (Eds.) *Animal physiology*. Sinauer Associates, Massachusetts, U.S.A, pp. 149-170.
- Hochachka, P.W.; Buck, L.T.; Doll, C.J.; Land, S.C. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA: Biochemistry*, 93 (9), 9493-9498.
- Hochachka, P.W.; Lutz, P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, B3: 435-459.

- Huggins, A.K., Munday, K.A. 1968. Crustacean metabolism. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.*, 3, 271-378.
- 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.*, A 99: 215-218.
- Lutz, P.L.; Nilsson, G.E. 1997. Contrasting strategies for anoxic brain survival-glycolysis up or down. *J. Experim. Biolo.*, 200, 411-419.
- Lyndon, A.R.E Houlihan, D.F. 1998. Gill protein turnover: costs of adaptation *Comp. Biochem. Physiol.*, 119A, 27-34.
- Marqueze, A. 2004. Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulata* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- 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.
- Newsholme, E.A.; Leech, A.R. 1983. Amino acid metabolism: Biochemistry for the medical sciences.
- 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. POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S.M. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, part B 127: 375-381.
- Oliveira, G.T., Eicheler, P., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. *J. Exp. Zool.*, A301, 240-248.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. *Mar. Biol.*, 139, 335-342.
- Oliveira, G.T.; Da Silva, R.S.M. 1997. Gluconeogenesis in hepatopâncreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118A (4), 1429-1435.
- Péqueux, A.; 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, pp. 2-47.
- Powers, L. W. e Bliss, D. E. (1983) Terrestrial adaptations. In: *The Biology of Crustacea* (Ed. By Bliss D. T.), vol. 8; pp. 271-333. Academic Press, N.Y.
- Richardson, N.A.; Anderson, A.J.; Sara, V.R. 1997. The effects insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105, 287-293.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena L., van Wormhoudt, A. 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 268, 47-67.
- Santos, L.S. dos; Habekost, L.; Da Silva, R.S.M.; Kucharski, L.C. 2004. Efeito da anoxia e da recuperação sobre os níveis de glicose livre e glicogênio em brânquias do *C. granulata* mantidos com dietas ricas em proteínas e carboidratos. XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE. Águas de Lindóia-SP, Brasil. Abstract pp. 11.021.
- Schein, V. 1999. Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. POA, Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Schmitt, S.C.; Santos, E.A. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A (2), 329-336.
- Smith, R.W., Houlihan, D.F., Nilsson, G.E.; Brechin, J.G. 1996. Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in the crucian carp. *Am. J. Physiol.* 271, 897-904.
- Traush, G.M.; Forget, Cl.; Devos, P. 1989. Bioamines-stimulated phosphorylation and (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B (3), 487-492.
- Turcato, G.S. 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. POA, Dissertação de Bacharelado em Ciências Biológicas-Zoologia. Instituto de Biociências, UFRGS
- Urich, K. 1994. *Comparative animal biochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos de animais submetidos a anoxia e recuperação, após serem alimentados com uma dieta rica em proteínas (RP) ou carboidratos (RC) demonstram que:

Após uma hora de anoxia a glicose hemolinfática aumentou três e quatro vezes em animais alimentados com dieta RC e RP, respectivamente. Entretanto três horas de recuperação os níveis glicêmicos retornaram aos valores semelhantes do grupo controle em ambos tratamentos alimentares.

A concentração de glicose livre tanto nas brânquias anteriores (BA) como nas brânquias posteriores (BP) em animais alimentados com dieta RC ou RP reduziram significativamente após uma hora de anoxia, mantendo-se reduzidos na recuperação.

Foi observado no grupo controle níveis significativamente maiores de glicogênio nas BA comparados com as BP na dieta RC. No entanto as concentrações de glicogênio reduziram somente após três horas de recuperação, tanto em BA como em BP, em animais alimentados com dieta RP.

O efeito da composição das duas dietas oferecidas (RP ou RC), não influenciaram significativamente os níveis de glicose livre e de glicogênio entre os grupos experimentais, tanto para as brânquias anteriores quanto para as brânquias posteriores.

Somente as brânquias anteriores apresentaram alteração do padrão do metabolismo energético do caranguejo *Chasmagnathus granulata* entre os grupos experimentais controle, anoxia e recuperação da anoxia, quando se compara as duas dietas oferecidas (carboidratos ou proteínas).

Em animais alimentados com dieta RP o hepatopâncreas reduziu significativamente a síntese protéica na anoxia e recuperação em 78% e 65% respectivamente. Mas animais alimentados com dieta RC aumentaram 42% a síntese protéica na recuperação.

No músculo de animais alimentados com dieta RC, aumentou 213% a síntese de proteínas na anoxia e redução de 12% na recuperação. A comparação do efeito das dietas RC e RP sobre a síntese de proteínas nos diferentes grupos experimentais mostrou uma diferença, mas não estatisticamente significativa nos tecidos hepatopâncreático e muscular.

As BA e BP reduziram significativamente a síntese protéica na anoxia em caranguejos alimentados com dieta RP. Mas na recuperação aeróbica houve um aumento de 13% a síntese protéica em animais alimentados com dieta RC.

Podemos concluir que a partir de todos estes resultados mais uma vez fica evidenciado a característica particular de cada tecido frente a um mesmo agente estressor.

## BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO E MÉTODOS

- Bond-Buckup, G.; Fontoura, N.f.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C. 1991. O Caranguejo: Manual para o ensino prático em zoologia; POA; Ed. Universidade/UFRGS.
- Boschi, E.E. 1964. Los crustáceos decápodes brachyura del litoral Bonaerense. Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata), 6, 1-76.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- Brito, S.R.C.; Moura, M.A.F.; Kawashita, N.H.; Brito, M.N.; Kettelhut, I.C.; Migliorini, R.H. 2001. Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. Metabolism., 50, 1208-1212.
- 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. pp. 263-289.
- Chang, E.S., R. Keller; S.A. 1998, Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses: Gen. Comp. Endocrinol., 111; 359–366.
- Chittó, A.L. F. 2000. Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico POA, Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- Cooper A.W. 1974. Salt Marshes. In: Odum, H., Copeland B.J., Macmahon E.A. (eds) Coastal Ecological Systems of United States. The Conservation Foundation, Washinton D C. V II pp. 55-98.
- Devlin, T.M. 2003. Manual de Bioquímica com correlações clínicas 5ª edição. Ed: Edgard Blücher Ltda, SP, 1084 p.
- Dias, G.S. 2000. Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no Gastrópode Pulmonado Terrestre *Megalobulimus oblongus* POA; Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Geary, N.; Langhans, W.; Scharrer, E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. Am. J. Physiol., 241(10): R330-335.
- Gonçalves A.A. 1993. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus*

- granulata* Dana:1851 (Crustácea: Decapoda: Grapsidae) durante anoxia ambiental. Rio Grande: FURG, 1993. Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica).
- Gu, P.L., Yu, K.L., Chan S.M. 2000. Molecular characterization of an additional shrimp hyperglycemic hormone: cDNA cloning, gene organization, expression and biological assay of recombinant proteins: FEBS Lett., 472, 122–128.
- Hartnoll, R.G. 1988. Evolution, systematics and Geographical Distribution. In: Burggren, W. and McMahon, B (eds). Biology of Land Crabs. Cambridge University Press, New York. P. 6-54
- Henry, R.P., Booth, C.E, Lallier, F., Walsh, P. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. J. Exp. Biol. 1866, 215-234.
- Herreid, C.F., Full, R.J. 1988. Energtics and locootion. Pp. 333-377. In: Burggren, W.W., McMahan, B.R. (eds.). Biology of the land crabs. Combridge Universty Press: Combridge.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Fréminet, A. 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). Physiol. Zoo.,l 68, 223-244.
- Hill, R.W. 1980. Intercambios de oxigeno y dióxido de carbono: el transporte en los líquidos corporales. Fisiologia Comparada. Reverté (ed.) pág. 517-520.
- Hochachka P.W., Somero G.N. 1984. Biochemical Adaptation. Priceton University Press, New Jersey. 538 p.
- Hochachka, P.W.; Lutz, P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. Comp. Biochem. Physiol., B 3: 435-459.
- Johnston, M.A; Davies, S.P. 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissue of *carcinus*. Comp. Biochem. Physiol. 41 B: 433-443
- Johnston, M.A; Elder, H.Y. ; Davies, S.P. 1973. Cytology of *Carcinus* Haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. Comp. Biochem. Physiol., 46 A: 569-581.
- Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. Experientia, 48: 439-448.
- Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. 1991a. Seasonal variation on the energy metabolism in na 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 na estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp. Biochem. Physiol., A 99: 215-218.
- Lutz, P.L.; Storey, K.B. 1997. Adaptations to variations in oxigen tension by

- vertebrates and invertebrates. In: Dantzler, W.H. (ed.) Handbook of Physiology – Comparative Physiology. Oxford: American Physiological Society, vol. II.
- Lyndon, A.R.E. Houlihan, D.F. 1998. Gill protein turnover: costs of adaptation Comp. Biochem. Physiol., 119A (1): 27-34.
- 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.
- Marks, D.B.; Marks, A.D.; Smith, C.M. 1996. Basic Medical Biochemistry-A Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins (eds), Baltimore, Maryland–USA.
- Marqueze, A. 2004. Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulata* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- 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.
- Moon, T.W. 1988. Adaptation, constraint and the function of the gluconeogenic pathway. Can. J. Zool. 66, 1059-1068.
- 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., Adamczewska, A. 2002. Utilization of glycogen, ATP, and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. Comp. Biochem. Physiol., A133, 813-825.
- Nery, L.E.M.; Santos, E.A. 1993. Carbohydrate Metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda) Comp. Biochem. Physiol. , 106B (3), 747-753.
- Newsholme, E.A.; Leech, A.R. 1983. Amino acid metabolism: Biochemistry for the medical sciences.
- Odum, E.P. 1985. Ecologia. Interamericana (ed), Rio de Janeiro, 435p.
- Oliveira, G.T.; Da Silva, R.S.M. 1997. Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp. Biochem. Physiol., 118 A (4): 1429-1435.
- 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. POA,

- Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S.M. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol., part B* 127: 375-381.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. *Mar. Biol.*, 139, 335-342.
- Oliveira, U.O. 2003. Efeitos da anoxia ambiental e da recuperação da anoxia sobre o balanço oxidativo no caranguejo *Chasmagnathus granulata*. POA, Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas de Saúde, UFRGS.
- Oliveira, G.T., Eicheler, P., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. *J. Exp. Zool.*, A301, 240-248.
- Pasteur, L. 1861. Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp. Rend. Acad. Sci.* 52, 1260-1264.
- Péqueux, A.; 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., pp. 2-47.
- Pothin, H. dos S. 1999. Alterações mecânicas, metabólicas e enzimáticas induzidas por peróxido de hidrogênio ou isquemia-reperfusão no coração isolado de rato. POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Powers, L. W. e Bliss, D. E. (1983) Terrestrial adaptations. In: *The Biology of Crustacea* (Ed. By Bliss D. T.), vol. 8; pp. 271-333. Academic Press, N.Y.
- Rathbun, M.J. 1918. The grapsoid crabs of America. Smithsonian Institution, Bull. U.S. Mus., 97: 97-445.
- Richardson, N.A.; Anderson, A.J.; Sara, V.R. 1997. The effects insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105: 287-293.
- Santos, E.A., Baldisseroto, B., Bianchini A., Colares E.P., Nery, L.E.M., Manzon, I.G.C. 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A, 21-25.
- Santos, E.A.; Keller, R. 1993. 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 (3): 343-347.
- Schein, V. 1999. Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. POA, Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básica de Saúde, UFRGS.
- Schein, V.; Waché, Y.; Etges, R.; Kucharski, L.C.R.; Van Wormhoudt, A.; Da Silva, R.S.M. 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Letters*, 561, 202-206
- Schmitt, S.C.; Santos, E.A. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion *Comp. Biochem. Physiol.* 106A (2): 329-336.
- Schmidt-Nielsen K. 1983. *Animal Physiology: Adaption and Environment*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Smith, R.W., Houlihan, D.F., Nilsson, G.E. e Brechin, J.G. 1996. Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in the crucian carp. *Am. J. Physiol.* (271): 897-904.
- Thrabrew, M.I.; Poat, P.C.; Munday, K.A. 1971. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B, 531-541.
- Trapp, M. 2000. Autofosforilação do receptor e transdução do sinal da insulina em brânquias de caranguejos *Chasmagnathus granulata* adaptados a diferentes dietas e ao jejum. POA, Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básica de Saúde, UFRGS.
- Traush, G.M.; Forget, Cl.; Devos, P. 1989. Bioamines-stimelated phosphorylation and (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase in the gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94 B (3): 487-492.
- Turcato, G.S. 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas-Zoologia) Instituto de Biociências.
- Urich, K. 1994. *Comparative animal bichemistry*. Springer-Verlag, Berlim, Germany.
- Van Aardt, W.J. 1988. Lactate metabolism and gucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni* calman fduring anoxia and subsequent recovery. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91A (2), 299-304.
- Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amount of tissue. *Analyt. Biochem.*, 11: 256-265.
- Vinagre, A.S. 1999. Metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus*

*granulata*: Efeito do jejum e da realimentação e da apedunculacão sobre a adaptacão ao estresse osmótico. POA, Tese de Doutorado em Ciências Biológicas–Fisiologia. Instituto de Ciências Básica da Saúde, UFRGS.

Vinagre, A.S., Da Silva, R.S.M. 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102 (3): 579-583.

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

Withers, P.C. 1992. Blood. In: *Comparative animal physiology*. Saunders College Publishing, Orlando, Florida, pp.728-755.

# ANEXO

## Guide for Authors

### COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

#### Aims and scope of CBP

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

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

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

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

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

#### Submission and review of manuscripts

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

**Authors** should provide names and addresses (including phone and fax numbers and e-mail address) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as reviewers. Authors are requested to select an appropriate section and suggest an associate editor of CBP.

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

#### Review articles

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

#### Online submission of papers

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

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

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

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

**Proofs:** The corresponding author will receive proofs by e-mail or post. Proofs must be checked immediately and returned to Elsevier. Corrections to the proofs should be restricted to printer's errors only. Substantial alterations may be charged to the

author. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

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

Page charges: CBP has no page charges.

Preparation of manuscripts

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

**Format:** All sections of the manuscript must be double-spaced with 2.5 cm (1 inch) margins. Pages should be numbered consecutively. Avoid footnotes. Underline only words or letters that will be printed in italics. Mark the position of each figure and table in the margin. The full Latin name of all species used in the study must be supplied.

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

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

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

**References:**

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Do not use et al. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc.

Follow the relevant examples below.

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

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

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

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

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

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

**Tables:** Tables should be prepared for direct camera copy or clearly typed as follows:

(a) Refer to current tables in the journal, for required spatial layout. If possible, a laser printer with a Times Roman font should be used.

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

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

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

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

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

1. Send only hard copies when first submitting your manuscript.

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

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

#### **Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:**

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

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

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

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

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

**Example 2:** "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a

B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

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

### **Summary of requirements**

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

### **Author enquiries**

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

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

**September 2002 version**