

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

**EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE A GLICONEOGÊNESE E A
NEOGLICOGENIOGÊNESE NO MÚSCULO DO CARANGUEJO *Chasmagnathus
granulatus* SUBMETIDO PREVIAMENTE À DIETA RICA EM PROTEÍNAS OU
CARBOIDRATOS**

Dissertação de Mestrado

RICARDO PELLEGRINO

Porto Alegre, 2006



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



Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfsio e-mail: ppgfsio@vortex.ufrgs.br

Rua Sarmiento Leite, 500 - 2º andar
90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3316-3453

Fax: (51) 3316-3656

**EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE A GLICONEOGÊNESE E A
NEOGLICOGENIOGÊNESE NO MÚSCULO DO CARANGUEJO *Chasmagnathus
granulatus* SUBMETIDO PREVIAMENTE À DIETA RICA EM PROTEÍNAS OU
CARBOIDRATOS**

RICARDO PELLEGRINO

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

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

Porto Alegre, agosto de 2006

Comissão Examinadora

Guendalina Turcato Oliveira
Prof^ª Doutora do Departamento de Ciências
Fisiológicas – Faculdade de Biociências - PUC/RS

Vera Maria Treis Trindade
Prof^ª Doutora do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS

Marcos Luiz Perry
Prof^º Doutor do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas: Bioquímica - UFRGS

Dedico esse trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Roselis Silveira Martins da Silva, pelo acolhimento, pela orientação e auxílio nos experimentos e principalmente pelos ensinamentos transmitidos com carinho e eficácia, que contribuíram imensamente em minha formação.

Ao meu co-orientador Professor Luiz Carlos Rios Kucharski, pelas valiosas instruções, pelos incentivos e pela indispensável atenção e dedicação aos detalhes que enriqueceram o desenvolvimento desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - Brasil e a Pró-Reitoria de Pós-graduação, pela concessão da Bolsa de Estudos e Auxílio Financeiro.

Aos amigos do laboratório, que compartilharam esse percorrer de conquistas com companheirismo, carinho, amizade e me proporcionaram um rico ambiente de trabalho. Sou muito grato pelos auxílios prestados nos experimentos e pela transmissão do conhecimento na realização de técnicas fundamentais relacionadas ao meu trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, pelo aprendizado, pela dedicação, pelo incentivo à busca de novos conhecimentos e pelos ótimos momentos de reflexão construtiva sobre a fisiologia.

Aos colegas e amigos do Departamento de Fisiologia, pela amizade, dicas e sugestões dispensadas em nosso convívio.

Aos funcionários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial às colegas da Secretaria do Curso de Pós-Graduação e da Biblioteca do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, que através de suas dedicações profissionais compõem um ambiente harmônico de agradável convívio.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de investigar, in vitro, o efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicogênio em músculo mandibular de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* previamente alimentados com dieta rica em carboidratos ou proteínas. Além disso, nas mesmas condições experimentais, foram determinadas as concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa e de glicogênio no músculo mandibular. Os resultados do presente trabalho demonstram que o *C. granulatus* é um caranguejo adaptado ao jejum mantendo a homeostase metabólica. Contudo, o padrão metabólico de adaptação ao jejum utiliza diferentes vias segundo a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo. Durante o jejum a capacidade gliconeogênica reduz em caranguejos mantidos com a dieta HC. Contudo, em animais mantidos com a dieta HP um aumento na atividade da via neoglicogeniogênica é constatado após 15 dias de jejum. Em caranguejos alimentados com a dieta HP as vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica estariam envolvidas na redução dos valores de lactato no período de realimentação. Entretanto, nos animais mantidos com a dieta HC estas vias seriam responsáveis pela manutenção dos níveis de lactato no estado alimentado.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KG – Alfa-cetoglutarato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

C. granulatus – *Chasmagnathus granulatus*

cDNA – Ácido desoxirribonucléico

CHH – Hormônio hiperglicemiante de crustáceo

DHAP – Diidroxiacetona fosfato

FBFase – Frutose-1,6-bifosfatase

G6Fase – Glicose-6-fosfatase

GTP – Guanosina trifosfato

HC – Carbohydrate-rich diet

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

HP – High-protein diet

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

OAA – Oxaloacetato

PC – Piruvato carboxilase

PEP – Fosfoenolpiruvato

PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PFK – Fosfofrutoquinase

PK – Piruvato quinase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SFC – Solução fisiológica de caranguejo

SNK – *Student-Newman-Keuls*

TCA – Ácido tricloracético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	
2.1 Geral	30
2.2 Específico	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Produtos utilizados	31
3.2 Coleta e manutenção dos animais	31
3.3 Procedimentos experimentais	32
3.4 Determinações bioquímicas	34
3.5 Análises estatísticas	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
4. ARTIGO CIENTÍFICO	48
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	54
3. RESULTADOS	58
4. DISCUSSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXO 1	73

1. INTRODUÇÃO

O caranguejo *Chasmagnathus granulatus* é uma espécie tipicamente estuarina adaptada ao ambiente de pântanos salgados ou marismas e situa-se sistematicamente na Superclasse Crustacea, Classe Malacostraca, Ordem Decapoda e Família Varunidae (Cuesta; Diesel; Schubart, 2001). Habita territórios neotropicais na zona mesolitoral e supralitoral a partir do estado do Rio de Janeiro até o Golfo de San Martin na Argentina (Turcato, 1990; Bond-Buckup et al., 1991). Uma região estuária constitui um ecossistema resultante da transição entre o ambiente marinho e o límnic, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros de completa exposição do substrato (Odum, 1985).

Em seu habitat, o caranguejo *C. granulatus* distribui-se por áreas com ou sem vegetação onde abre galerias ou tocas com dimensões variáveis, conforme os níveis da maré e do lençol freático. Esse procedimento garante a presença de água no fundo da toca e minimiza as amplitudes de variações de salinidade e de temperatura, colaborando de modo relevante em sua ecofisiologia (Botto; Irigoyen, 1980). Os animais maiores, principalmente os machos, são facilmente encontrados em locais abertos, enquanto as fêmeas e os animais jovens buscam refúgio junto à vegetação ribeirinha (Bond-Buckup et al., 1991) formada, em grande parte, por juncos. Segundo Turcato (1990), nos meses de primavera e de verão, esses caranguejos são encontrados na zona infralitoral em busca de alimento. Já nos meses de outono e inverno, permanecem no interior das tocas por um período maior e apresentam uma redução metabólica (D’Incao; Ruffino; Silva, 1988). É importante observar que no período de inverno, além da baixa temperatura ambiente (média de 15°C), o *C. granulatus* depara-se com uma baixa oferta de itens alimentares e, conseqüentemente, menor disponibilidade de substrato energético (D’Incao et al., 1990).

Esse caranguejo, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos et al., 1987), é capaz de suportar longos períodos fora da água e de exposição ao sol, sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon et al., 1974). Quando exposto ao ar atmosférico, diminui o consumo de oxigênio e reduz a mobilidade (Santos et al., 1987). Algumas espécies de caranguejos, assim como o *C. granulatus*, possuem habilidade em manter as brânquias constantemente umedecidas ao sair do ambiente aquático, através de um sistema de circulação localizado entre as bases dos pereiópodos que captam a água da superfície externa do corpo e a liberam na cavidade branquial, promovendo a renovação dos teores de oxigênio (Hartnoll, 1988; Bond-Buckup et al., 1991; Luquet et al., 2000).

Turcato (1990), analisando amostras da água da lagoa de Tramandaí – local de coleta dos animais estudados neste trabalho, encontrou uma importante variação do teor de oxigênio dissolvido (2,78 - 11,78mgO₂/L) e da salinidade (0,22‰ - 34‰). A permanência do caranguejo *C. granulatus* em locais com essas características, afirma sua grande capacidade em suportar variações de salinidade e teor de oxigênio. Conforme Mañe-Gazon et al. (1974), essa espécie pode ser classificada como um animal regulador eurialino hiper-hiposmótico, pois suporta variações de salinidade de 0‰ até 40‰, ou seja, em um meio de alta concentração mantém a hemolinfa hiposmótica e, em um meio diluído, hiperosmótica. Cabe ressaltar, que o animal osmorregulador é capaz de tolerar, com mínimas alterações na osmolaridade hemolinfática, as grandes variações de salinidade de seu habitat (Huggins; Munday, 1968; Mantel; Farmer, 1983). Segundo Bromberg (1992), o *C. Granulatus* apresenta um ponto isosmótico situado entre 28,5‰ e 30‰ no inverno e no verão, respectivamente. Santos e Nery (1987) encontraram alterações nos níveis de glicose

na hemolinfa do *C. granulatus*, submetido a diferentes salinidades e, concluíram, ser uma espécie melhor adaptada ao estresse hiperosmótico que ao hiposmótico.

Em relação ao comportamento alimentar, o *C. granulatus* é uma espécie onívora-detritívora e alimenta-se na natureza, predominantemente, de vegetais e detritos (Bond-Buckup et al., 1991). O hábito alimentar oportunista foi caracterizado por meio de análise do conteúdo estomacal, no qual foi constatado a presença de sedimentos e de restos de origem vegetal e animal, como também, revelou diferenças quantitativas e qualitativas de alguns itens alimentares conforme a estação do ano (D’Incao et al., 1990). Este caranguejo, oportunamente alimenta-se de animais em avançado estado de decomposição e, eventualmente, comporta-se como canibalista, atacando suas próprias comunidades (Botto; Irigoyen, 1980).

O *C. granulatus* é um caranguejo adaptado ao jejum, sendo capaz de manter a homeostase metabólica e após a realimentação, apresenta um ajuste nos processos endergônicos de síntese para recuperar as reservas energéticas exauridas durante o jejum (Vinagre; Da Silva, 2002). Kucharski e Da Silva (1991a) verificaram que esse animal adapta-se com facilidade a diferentes dietas e, assim como em vertebrados, a composição da dieta influencia o padrão do metabolismo de carboidratos. No animal alimentado com uma dieta rica em proteínas (HP)¹, os valores de glicose na hemolinfa e a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo estão reduzidos, já no animal alimentado com dieta rica em carboidratos (HC), a homeostase do metabolismo de carboidratos fica revertida, elevando os níveis glicêmicos e os de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo (Kucharski; Da Silva, 1991a).

¹ A tabela 1 (item 3.2 – Procedimentos experimentais) traz informações sobre as dietas oferecidas aos caranguejos.

Foi demonstrado que durante o jejum de 3 semanas ocorre diminuição da síntese de glicogênio a partir de U-¹⁴C-glicina no músculo de *C. granulatus*, contudo, após o período de realimentação por 48 horas, esses valores se assemelham àqueles do grupo alimentado (Vinagre; Da Silva, 2002). Algumas espécies de crustáceos, como o isópode hipógeno *Stenasellus virei*, sobrevivem a períodos de jejum superiores a duzentos dias (Hervant et al., 1997), demonstrando uma distinta e eficiente resposta metabólica para manter as reservas energéticas e, além disso, durante a realimentação, apresentam uma rápida recuperação das reservas exauridas (Hervant; Renault, 2002). Pascual et al. (2006), estudando as alterações fisiológicas durante o jejum no camarão *Litopenaeus vannamei*, verificaram que a composição da dieta previamente oferecida modifica a resposta metabólica durante a restrição alimentar. Os animais que receberam dieta com níveis de proteínas adequados demonstraram um padrão metabólico mais favorável ao jejum quando comparados aos animais que receberam dieta restrita em proteínas.

Os resultados do estudo realizado por Vinagre e Da Silva (1992), onde foi verificado o efeito do jejum de oito semanas no metabolismo de carboidratos e de lipídios em *C. granulatus*, demonstraram que, nos animais previamente alimentados com dieta HC, os níveis de glicose hemolinfática diminuíram progressivamente nas duas primeiras semanas de jejum, permanecendo estáveis até o final do período experimental. A concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo, que inicialmente era maior que aquela dos animais alimentados com dieta HP, diminuiu progressivamente, chegando a valores bastante reduzidos após dois meses de restrição alimentar. Nos animais alimentados com dieta HP, os valores de glicose hemolinfática não apresentaram alterações significativas, permanecendo estáveis até o final do período experimental. Os valores de glicogênio hepatopancreático não apresentaram alterações significativas ao longo desse

período. Contudo, os níveis de glicogênio muscular diminuíram no início do jejum, permanecendo sem alterações significativas até o final do período. Nas brânquias, os valores de glicogênio foram semelhantes, tanto em animais alimentados com a dieta HP como naqueles submetidos à dieta HC e diminuíram progressivamente ao longo do jejum, chegando a valores nulos após dois meses. Em relação ao metabolismo dos lipídios, a dieta previamente oferecida ao caranguejo também alterou o padrão de resposta ao jejum. Nos animais alimentados com a dieta HC os níveis de lipídios totais na hemolinfa aumentaram cerca de 40% nas duas primeiras semanas de jejum, entretanto, ao final do período experimental, os valores eram 44% menores quando comparados aqueles dos caranguejos alimentados. No hepatopâncreas, os níveis de lipídios totais não sofreram variações significativas ao longo do período de jejum estudado, mas, no músculo, os valores de lipídios totais diminuíram cerca de 54% em relação aos valores iniciais. Os níveis de lipídios na hemolinfa dos animais do grupo HP aumentaram 100% nas duas primeiras semanas de jejum, mas ao final do período experimental retornaram a valores similares aos iniciais. Já os níveis de lipídios totais no hepatopâncreas diminuíram cerca de 51% após as oito semanas de jejum. Enquanto no músculo não foram constatadas variações significativas ao longo do período de jejum estudado (Vinagre e Da Silva, 1992).

Na análise desses resultados, Vinagre e Da Silva (1992) sugeriram que, durante o jejum, os níveis glicêmicos dos animais alimentados com dieta HC seriam inicialmente mantidos pelo processo de glicogenólise e, posteriormente, por uma ativação da via gliconeogênica. Por outro lado, nos animais alimentados com dieta HP, a via gliconeogênica já estaria ativa devido ao grande aporte de aminoácidos oriundos da dieta, sendo responsável pela manutenção da glicemia ao longo do jejum constatada nesse grupo. Nesse mesmo trabalho, foi estudado o efeito do jejum sobre o metabolismo de proteínas,

mas, ao contrário do observado com relação ao metabolismo de carboidratos e lipídios, a administração de uma dieta HC ou HP não causou alterações significativas nos parâmetros analisados.

Posteriormente, Oliveira e Da Silva (1997) não encontraram diferença significativa na atividade gliconeogênica hepatopancreática entre caranguejos alimentados com uma dieta rica em carboidratos e aqueles mantidos com dieta rica em proteínas.

Os resultados desses trabalhos evidenciam a importância dos estudos, *in vivo* e *in vitro*, com a finalidade de determinar o efeito da composição da dieta no padrão de ajuste metabólico durante o jejum e o processo de realimentação.

Oliveira et al. (2004), estudando o efeito de diferentes tempos de jejum sobre a capacidade de conversão de ^{14}C -alanina ou ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose no hepatopâncreas, verificaram que os animais previamente alimentados com a dieta HP, apresentavam no terceiro dia de jejum, uma redução na capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -alanina. Contudo, aos 15 dias de restrição alimentar, a gliconeogênese a partir de ^{14}C -alanina aumentou significativamente em relação aos valores iniciais, para novamente diminuir aos 21 dias de jejum. Já a conversão do ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose não apresentou alteração em relação aos valores iniciais.

Nos animais alimentados com dieta HC, o glicogênio hepatopancreático foi a principal fonte energética durante o período de restrição alimentar, apesar da conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose ter aumentado aos 15 dias de jejum. Quando foi utilizado o ^{14}C -lactato, a síntese de ^{14}C -glicose foi significativamente menor aos 6, 15 e 21 dias de jejum (Oliveira et al., 2004). Esses resultados reforçaram os dados obtidos por Vinagre e

Da Silva (1992) e sustentam a presença da via gliconeogênica no tecido hepatopancreático do caranguejo *C. granulatus*, bem como a sua participação durante diferentes períodos de jejum.

A realimentação após períodos de restrição alimentar pode ser definida como sendo um estado nutricional transitório, com características distintas tanto do jejum como do período absorptivo e pode ser considerada como um “estado de histeria metabólica”, onde os processos de síntese são reativados, porém de forma demorada ou exacerbada (Sugden et al., 1989). Alguns autores mostraram em vertebrados que a síntese de glicogênio durante o processo de realimentação ocorre pela via indireta e envolve a gliconeogênese. Essa condição ficou conhecida como “paradoxo da glicose”, onde a glicose forma compostos de três carbonos antes de ser estocada como glicogênio, ao invés da via direta, onde a glicose é fosforilada e incorporada à molécula de glicogênio (Newgard et al., 1984; Sugden et al., 1989; Shulman; Landau, 1992). Nas investigações de Calder e Guedes (1992) com ratos realimentados após 40 horas de jejum foi constatado um aumento marcante na síntese de glicogênio, tanto no músculo como no fígado, alcançando valores superiores em relação aos animais alimentados. Nesses animais, no período de realimentação, há uma maior atividade dos processos endergônicos de síntese caracterizados por uma “superestimulação” na síntese de glicogênio. Tal ocorrência já havia sido notificada no fígado e no músculo de tartaruga e de peixe quando realimentados após 30 dias de jejum (Da Silva; Migliorini, 1990; Machado et al., 1988).

Estudos com diferentes espécies de crustáceos demonstram grande diversidade na estratégia metabólica utilizada durante a realimentação. Em *Gammarus fossarum*, o período de sete dias de realimentação promoveu uma recuperação parcial das reservas energéticas exauridas durante o jejum. Já nos anfípodes *Niphargus virei* e

Niphargus rhenorhodanensis uma plena recuperação das reservas foi estabelecida durante quinze dias de realimentação (Hervant et al., 1999). Esse padrão diferencial de resposta ao jejum vem chamando a atenção de alguns pesquisadores, sendo que as recentes investigações realizadas sobre o processo de jejum e da realimentação em crustáceos demonstram um importante avanço para o campo da fisiologia comparada e representam um ponto, ainda pouco explorado, que exhibe uma relevante contribuição ao esclarecimento de muitas atividades enzimáticas envolvendo os processos gliconeogênicos e neoglicogeniogênicos nesses animais.

A gliconeogênese é o processo da produção e exportação de glicose a partir de precursores como os aminoácidos, o lactato e o glicerol. Esta via é filogeneticamente muito antiga sendo encontrada desde fungos até mamíferos (Moon, 1988) e conecta o metabolismo de carboidratos, de lipídios e de aminoácidos (Newsholme; Leech, 1983). Nos mamíferos a gliconeogênese ocorre no fígado, nos rins e no intestino delgado (Newsholme; Leech, 1983; Mithieux et al., 2004; Habold et al., 2005). As atividades das quatro enzimas-chave da gliconeogênese - piruvato carboxilase (PC, E.C. 6.4.1.1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, E.C. 4.1.1.32), frutose-1-6-bifosfatase (FBFase, E.C. 3.1.3.11) e glicose-6-fosfatase (G6Fase, E.C. 3.1.3.9) - têm sido investigadas em uma variedade de espécies de invertebrados e vertebrados não mamíferos (Surholt; Newsholme, 1981; Moon, 1988).

As enzimas regulatórias da via glicolítica – hexoquinase (ou glicoquinase no fígado), 6-fosfofrutoquinase e piruvato quinase – catalisam as etapas irreversíveis em condições intracelulares. Durante a gliconeogênese devem ocorrer reações distintas para contornar essas etapas. A enzima G6Fase converte glicose-6-fosfato em glicose e a enzima FBFase converte frutose-1,6-bifosfato em frutose-6-fosfato. Já a conversão de piruvato em

fosfoenolpiruvato pela via gliconeogênica requer duas etapas separadas que consomem energia e são catalisadas pela PC e pela PEPCK. A PC converte piruvato em oxaloacetato e envolve a hidrólise de um ATP (adenosina trifosfato); a PEPCK catalisa a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato e envolve a hidrólise de um GTP (guanosina trifosfato) (Figura 1). A redução do 1,3-difosfoglicerato em gliceraldeído 3-fosfato resulta na oxidação de um NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida) (Newsholme; Leech, 1983).

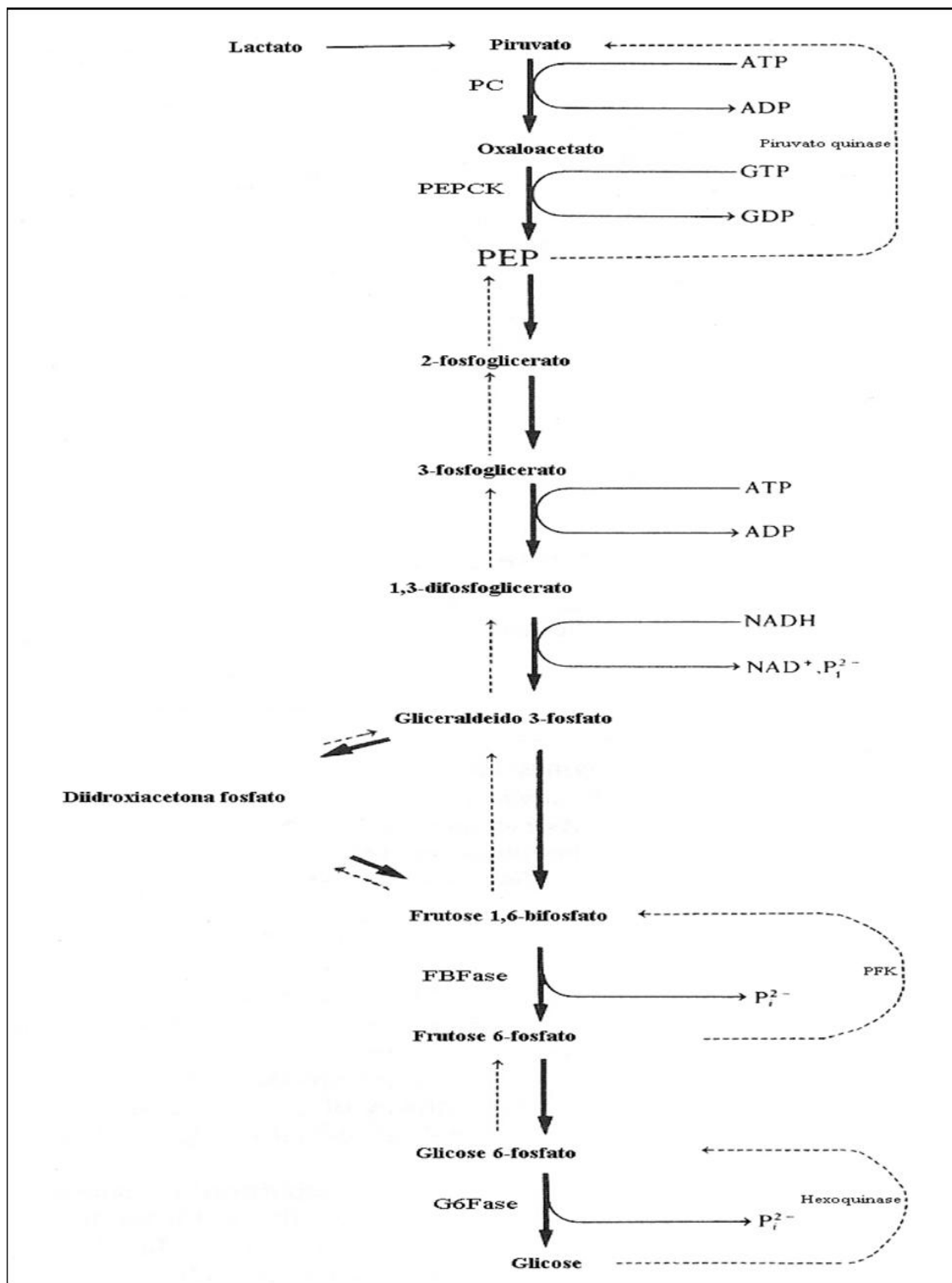


Figura 1: Via gliconeogênica a partir de lactato. As linhas tracejadas referem-se à via glicolítica. Abreviaturas: PC, piruvato carboxilase; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; PFK, fosfofrutoquinase. Adaptado de Newsholme e Leech (1983).

A localização das enzimas gliconeogênicas, principalmente a PEPCK, apresenta uma variação entre as espécies (Kraus-Friedmann, 1984; Moon, 1988; Corssmitt et al., 2001). A PC localiza-se na mitocôndria, a PEPCK localiza-se tanto no citosol como na mitocôndria e as demais enzimas gliconeogênicas encontram-se no citosol (Newsholme; Leech, 1983). Essa localização da PC torna a mitocôndria um local obrigatório para a conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato, onde existem duas vias para que o oxaloacetato seja convertido em fosfoenolpiruvato. A via mais simples envolve a PEPCK mitocondrial, onde o fosfoenolpiruvato produzido atravessa a membrana mitocondrial interna. A segunda via envolve a conversão de oxaloacetato, que não atravessa a membrana mitocondrial interna, em aspartato que é transportado para o citosol através do antiporte glutamato-aspartato. No citosol, o aspartato é novamente convertido em oxaloacetato (Devlin, 1998) (Figura 2).

Uma via alternativa para que o oxaloacetato deixe o espaço mitocondrial seria a sua redução a malato que atravessa a membrana mitocondrial. No citosol, o malato pode ser oxidado novamente em oxaloacetato com formação de NADH que será utilizado posteriormente na redução do 1,3-difosfoglicerato (Newsholme; Leech, 1983).

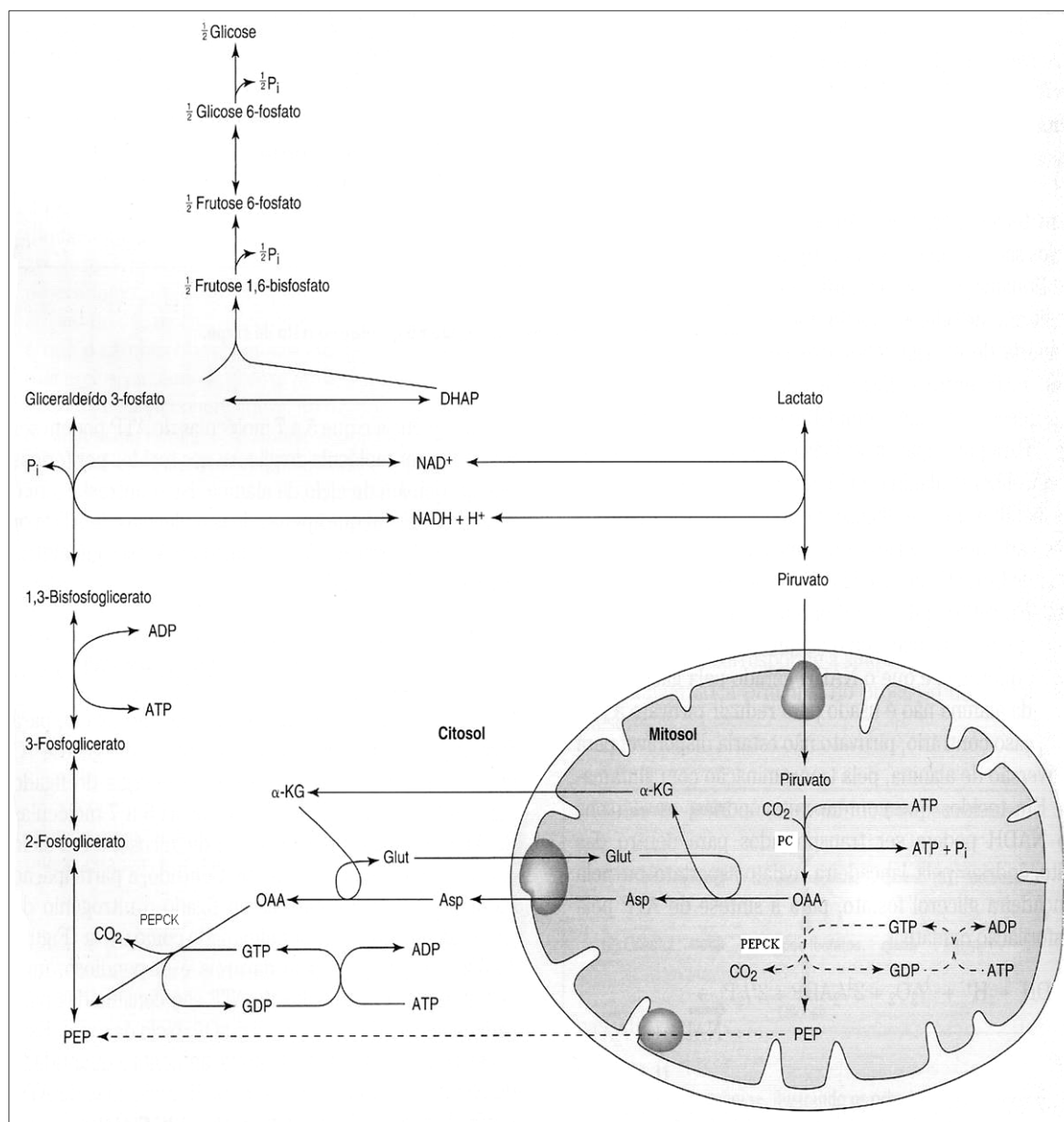


Figura 2: Via gliconeogênica a partir de lactato. As linhas tracejadas referem-se à via da PEPCK Mitochondrial. Abreviaturas: PC, piruvato carboxilase; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinase; PEP, fosfoenolpiruvato; OAA, oxaloacetato; α -KG, α -cetoglutarato; DHAP, diidroxiacetona fosfato. Adaptado de Devlin, 1998.

Nos invertebrados, a participação da via gliconeogênica na manutenção da glicose hemolinfática difere entre as espécies (Moon, 1988). Estudos em vertebrados mostram que a PEPCK citosólica é regulada por grande variedade de estímulos hormonais, enquanto que a fração mitocondrial parece ser constitutiva. Os principais fatores que

umentam a expressão gênica da PEPCK citosólica incluem AMPc (adenosina monofosfato cíclico), os hormônios glicocorticóides, glucagon e tireoideanos. Já a insulina e a glicose inibem esse processo (Moderassi et al., 1998). Em humanos, a PEPCK localiza-se tanto no citosol como na mitocôndria (Corssmitt et al., 2001). Em aves, a PEPCK hepática tem maior atividade mitocondrial (Moon, 1988). Um estudo realizado com rim de frango verificou que a acidose e o jejum não alteram a expressão da fração mitocondrial mas aumentam a atividade da PEPCK citosólica (Watford et al., 1981). Em codornas submetidas ao jejum prolongado, foi verificada, *in vivo*, uma correlação positiva entre o aumento da atividade da PEPCK renal e hepática com a gliconeogênese (Sartori et al., 2000). Em trutas a PEPCK foi parcialmente clonada e seqüenciada, sendo semelhante à enzima mitocondrial de mamíferos (Panserat, et al., 2001). Zammit e Newsholme (1978) estudaram a atividade da PEPCK no músculo do caranguejo ferradura *Limulus polyphenus* e da lagosta *Homarus vulgaris* e sugeriram que essa enzima participa da oxidação de alguns aminoácidos através da conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato. A atividade da PEPCK e da FBFase foi demonstrada em tecidos do siri *Callinectes sapidus* (Lallier; Wash, 1991) de caranguejos *Chaceon fennei* e *Chaceon quinquendes* (Walsh; Henry, 1990) e em crustáceos hipógenos e epígenos (Hervant, 1996).

Em caranguejos *C. granulatus* a via gliconeogênica estaria envolvida em vários processos de ajuste metabólico durante o estresse osmótico, a anoxia e a fase de recuperação da anoxia. Nesse caranguejo essa via foi constatada no músculo, brânquias e hepatopâncreas (Schein et al., 2004; Chittó, 2000, 2005; Oliveira; Da Silva, 1997). No hepatopâncreas de *C. granulatus*, a presença dessa via e a atividade da enzima PEPCK foram evidenciadas pela primeira vez por Oliveira e Da Silva, (1997).

Em *C. granulatus* alimentados, inversamente ao que ocorre em vertebrados (Migliorini et al., 1973; Moon, 1988), a capacidade intrínseca do hepatopâncreas em sintetizar glicose é alta, independe do tipo da dieta oferecida e, de 84 a 89% da atividade da enzima PEPCCK ocorre na fração mitocondrial (Oliveira; Da Silva, 1997). Esses resultados demonstram que o hepatopâncreas é um tecido gliconeogênico. Logo, esses autores referiram que a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica permite ao *C. granulatus* responder a variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, a temperatura, o ciclo das marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose. A glicose é o principal substrato energético em caranguejos, sendo o principal monossacarídeo na hemolinfa de crustáceos (Chang e O'Connors, 1983; Morris e Airries, 1998). Nesses animais, a glicose tem cinco destinos principais: síntese de mucopolissacarídeos, síntese de quitina, síntese de ribose e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, síntese de glicogênio e formação de piruvato (Hochachka et al, 1970; Herreid; Full, 1988).

Em *C. Granulatus* a gliconeogênese e a atividade da PECK muscular apresentam uma variação sazonal: durante o inverno as atividades da via e da PEPCCK mitocondrial estão bastante reduzidas, sendo a atividade da enzima igualmente dividida entre as frações citosólicas e a mitocondrial. Por outro lado, no verão 85% da atividade da PEPCCK encontra-se na fração mitocondrial (Schein et al., 2005a).

O processo conhecido como neoglicogeniogênese consiste na síntese de glicogênio a partir de substratos que não sejam carboidratos, em especial o lactato (Newsholme; Leech, 1983). Essa via foi demonstrada em músculo esquelético de mamíferos e músculo de crustáceos nos estudos de Hermansen e Vaage (1977), Xavier et al. (2002), Hervant et al. (1999).

Foi postulado que em músculo esquelético de humanos, o glicogênio possa ser sintetizado a partir do lactato sob determinadas condições metabólicas, onde as concentrações de lactato estejam elevadas e as reservas de glicogênio depletadas, por exemplo, após exercício físico (Hermansen; Vaage, 1977). Tal possibilidade teórica pode ser amparada através dos achados de Bergström et al. (1967) que demonstraram a influência das concentrações de glicogênio muscular durante a realização de exercícios em humanos. Em músculo de rato, foi demonstrado que a via neoglicogeniogênica não utiliza a enzima PEPCK, mas uma possível inversão do fluxo metabólico da reação catalisada pela enzima piruvato quinase (PK) que levaria à síntese de glicogênio a partir de $[U^{14}C]$ L-lactato (Xavier et al., 2002). Em músculo de ratos a atividade da PEPCK é muito baixa e encontra-se na ordem de 10^{-12} molar (Xavier et al., 2002). No músculo de *C. granulatus* a atividade da PEPCK está na ordem de 10^{-9} molar, sendo aproximadamente 90% dessa atividade encontrada na fração mitocondrial (Schein et al., 2004).

A ocorrência da gliconeogênese (*gluconeogenesis*) e da neoglicogeniogênese (*glyconeogenesis*) em crustáceos, principalmente decápodes, já foi demonstrada utilizando-se ^{14}C -lactato, ^{14}C -aminoácido e ^{14}C -glicerol (Hill; Taylor; Strang, 1991; Lallier; Walsh, 1992; Henry et al., 1994; Oliveira; Da Silva, 1997; Hervant et al., 1999; Vinagre; Da Silva, 2002; Chittó, 2005). O hepatopâncreas parece ser o principal local onde ocorre a gliconeogênese (Van Aardt, 1988; Hill; Taylor; Strang, 1991; Lallier; Wash, 1992; Oliveira; Da Silva, 1997; Hervant et al., 1999), embora alguns estudos apontem a presença dessa via em brânquias (Thabrew; Poat; Munday, 1971; Chittó, 2000; 2005) e hemócitos (Johnston; Davies, 1973). Schein et al. (2004) demonstraram a capacidade de conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose e a atividade da PEPCK no músculo mandibular de *C. granulatus*. Verificaram a expressão do gene da PEPCK em

hepatopâncreas, coração, brânquias e sistema nervoso desse caranguejo, como também, caracterizaram a seqüência do cDNA dessa enzima (AY074922) no músculo mandibular. Em diferentes espécies de crustáceos foram detectadas, em diversos tecidos, atividades muito baixas das enzimas FBFase, G6Fase e PEPCK (Thabrew; Poat; Munday, 1971; Walsh; Henry, 1990; Lallier e Walsh, 1991; Henry et al., 1994; Hervant, 1996). Recentemente, foi verificado que o músculo mandibular de *C. granulatus* apresenta atividade da enzima G6Fase, demonstrando que a via gliconeogênica nesse tecido seria completa pela possibilidade de liberar glicose na hemolinfa (Chittó, 2005).

O estudo da variação sazonal sobre o metabolismo energético do caranguejo *C. granulatus* demonstrou que o glicogênio do hepatopâncreas e do músculo constituem fonte de substrato energético durante a primavera e o verão. Já os lipídios musculares seriam utilizados como substrato energético no outono e no inverno, enquanto os lipídios do hepatopâncreas seriam mobilizados somente durante o período reprodutivo (Kucharski; Da Silva, 1991b). O transporte de lipídios em crustáceos ocorre por lipoproteínas de alta densidade (Garcia; Gonzalez-Baro; Pollero, 2002). Os principais lipídios são neutros e destes, 90% são triacilglicerois (Gilbert; O'Connor, 1970; Allen; Tyler; Varney, 2000). A variação sazonal na concentração de carboidratos em diferentes tecidos do *C. granulatus* parece interferir na sua capacidade osmorreguladora. No verão, após o choque hiposmótico ou hiperosmótico, os níveis de carboidratos aumentaram em quase todos os tecidos estudados por Nery e Santos (1993), sugerindo a ativação da via gliconeogênica. Contudo, no inverno, em ambos os tipos de estresse osmótico, ocorreu mobilização de carboidratos somente nas brânquias. Schein et al. (2005a) verificaram que a atividade gliconeogênica no músculo mandibular do *C. granulatus*, no verão, diminuiu após 24 horas de estresse hiperosmótico e inverteu a atividade da PEPCK no espaço intracelular, isto é, diminuiu a

atividade na fração mitocondrial e aumentou na fração citosólica. No entanto, após 72 horas de choque hiperosmótico, os autores encontraram um aumento na atividade gliconeogênica, possivelmente, devido a um aumento na expressão gênica da PEPCCK ocorrido às 24 horas de estresse osmótico. No inverno, durante o choque hiposmótico, a capacidade gliconeogênica e a atividade da PEPCCK foram reduzidas e a expressão gênica da enzima achava-se extremamente reduzida. Esses dados demonstram que a via gliconeogênica muscular está envolvida nos ajustes metabólicos de adaptação os choques hiposmótico e hiperosmótico e pode ser modulada conforme a estação do ano (Schein et al., 2005a).

A dieta a qual o *C. granulatus* é adaptado antes de iniciar o estresse osmótico também altera o padrão de resposta do metabolismo de carboidratos no decorrer desse processo (Da Silva; Kucharski, 1992; Schein, 1999). Durante o estresse hiposmótico, em caranguejos alimentados com as dietas HC ou HP, os valores de glicose circulante aumentaram. Os animais que receberam uma dieta HC, apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de glicogênio hepatopancreático e muscular. Entretanto, no grupo que recebeu a dieta HP, o glicogênio do hepatopâncreas aumentou e o muscular permaneceu inalterado após 72 horas de estresse hiposmótico, reforçando o possível envolvimento da via gliconeogênica (Da Silva; Kucharski, 1992).

Vinagre (1999) constatou que a ablação bilateral dos pedúnculos oculares não alterou a resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico em *C. granulatus*. Logo, foi proposto o envolvimento de bioaminas ou de isoformas do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH), produzidas em outros tecidos que não os da glândula do seio no pedúnculo ocular, que agiriam aumentando os níveis circulantes de glicose durante o estresse hiposmótico.

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática na adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo *C. granulatus*. Animais alimentados com dieta HP e submetidos ao estresse hiposmótico, durante um período de 144 horas, apresentaram um aumento na capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -alanina às 72 horas de estresse. Nos animais submetidos a uma dieta HC o referido aumento somente foi verificado às 144 horas de estresse. Porém, quando o substrato utilizado era o ^{14}C -lactato, ambos grupos apresentaram uma redução na capacidade gliconeogênica a partir de 72h de estresse hiposmótico. Esses dados sugerem que a gliconeogênese hepatopancreática está envolvida no ajuste metabólico de aminoácidos durante o estresse hiposmótico.

No estudo de Schein (1999), os caranguejos alimentados com dieta HC e submetidos ao estresse hiperosmótico por um período de 144 horas aumentaram em 40% a concentração de glicose hemolinfática no final do período experimental. No tecido muscular, 24 horas de estresse hiperosmótico aumentaram os níveis de glicogênio em 3,7 vezes, entretanto, às 72 horas e às 144 horas diminuíram gradualmente, atingindo valores semelhantes àqueles do grupo controle; os níveis de glicose livre e a captação de glicose não apresentaram alterações significativas nesse tecido. As concentrações de glicose livre e de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores desses animais não foram afetadas pelo estresse hiperosmótico (Schein, 1999).

Schein (1999) também verificou que em animais alimentados com dieta HP, submetidos aos mesmos tempos de estresse, não foram observadas alterações significativas nos níveis de glicose na hemolinfa. A concentração de glicogênio hepatopancreático diminuiu 60% nas primeiras 24 horas e retornou aos valores do grupo controle às 144 horas. Os níveis de glicose livre aumentaram 40% às 72 horas, porém, não houve alteração

significativa na captação de glicose. No tecido muscular não foram verificadas variações significativas dos valores de glicogênio, de glicose livre e de captação de glicose. Tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores, o estresse hiperosmótico registrou aumento nos níveis de glicose e de glicogênio. Em ambas as dietas, HC e HP, 72 horas de estresse hiperosmótico, não determinaram alterações significativas na capacidade de captação de glicose nas brânquias anteriores e posteriores (Schein, 1999).

Nesse mesmo estudo, Schein (1999) determinou as concentrações hemolinfáticas de diferentes aminoácidos em caranguejos *C. granulatus* alimentados com dietas HC ou HP e não constatou diferença significativa entre os dois grupos experimentais. Os principais aminoácidos circulantes encontrados foram a glicina, a serina, a arginina, a alanina e a prolina. Entretanto, quando estes animais foram submetidos ao estresse hiperosmótico, diferenças significativas nas concentrações hemolinfáticas desses aminoácidos foram observadas nos animais alimentados com uma dieta HP ou HC. No grupo HP os níveis hemolinfáticos de glicina diminuíram e as concentrações de arginina, de alanina e de prolina aumentaram ao longo do período de estresse osmótico estudado, contudo, as concentrações de serina não sofreram variações significativas. Nos animais alimentados com dieta HC, as concentrações hemolinfáticas de glicina, de serina e de arginina diminuíram marcadamente durante o estresse hiperosmótico, enquanto os níveis de alanina e de prolina permaneceram constantes no período de estresse estudado. Esses resultados sugerem que a composição da dieta oferecida ao *C. granulatus* interfere no padrão de resposta metabólica e na composição dos aminoácidos hemolinfáticos durante a aclimatação ao estresse osmótico (Schein, 1999).

Na literatura consultada, numerosos trabalhos afirmam que crustáceos mantêm intracelularmente aminoácidos livres que, somados a compostos nitrogenados,

perfazem de 50 a 60% dos efetores osmóticos nesses animais e apresentam uma concentração aproximadamente 10 vezes maior que a encontrada nos tecidos de mamíferos. Entre esses têm maior relevância os aminoácidos arginina, alanina, glicina, prolina, ácido glutâmico e taurina (Huggins; Munday, 1968; Mantel; Farmer, 1983; Robertson; Cowey; Leaf, 1992; Gilles, 1997). Segundo Gilles (1982, 1997), as mudanças na concentração de aminoácidos livres tissulares durante o ajuste osmótico ocorrem por meio de três mecanismos básicos: (1) deslocamento do equilíbrio entre influxo e efluxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; (2) alterações na capacidade de síntese e oxidação desses aminoácidos; (3) modificações na capacidade de síntese e degradação de proteínas.

Recentemente, Schein et al. (2005b) verificaram, no hepatopâncreas e no músculo de *C. granulatus*, que o aumento na captação e redução na oxidação de aminoácidos seriam mecanismos envolvidos no aumento da concentração dos aminoácidos intracelulares em resposta ao estresse hiperosmótico. Entretanto, em caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico, a oxidação total de aminoácidos não seria um dos mecanismos envolvidos na redução da concentração intracelular de aminoácidos nos tecidos hepatopancreático e muscular.

Kucharski et al. (1997) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, a presença de receptores à insulina em brânquias do caranguejo *C. granulatus*. Estes receptores apresentam propriedades semelhantes àquelas observadas em receptores de insulina em tecidos-alvo clássicos de vertebrados. Kucharski et al. (1999) também demonstraram que os receptores à insulina nas brânquias do caranguejo *C. granulatus* pertenciam à família tirosina quinase como os receptores de mamíferos. Estes autores sugerem que no *C. granulatus* a transdução do sinal da insulina em células branquiais é similar àquela de

mamíferos, com ligação do hormônio à subunidade alfa, autofosforilação da subunidade beta e fosforilação de proteínas citoplasmáticas.

Estudos, *in vitro*, demonstram que a insulina de mamífero estimula a captação de glicose e síntese de glicogênio somente nas brânquias posteriores (Kucharski et al., 2002). Trapp et al. (2002) realizaram a clonagem parcial da região tirosina quinase do receptor de insulina a partir do tecido branquial de *C. granulatus*. Recentemente, Trapp (2005) demonstrou redução no número, afinidade e atividade tirosina quinase do receptor de insulina em brânquias posteriores de *C. granulatus* submetido ao estresse hiperosmótico durante 144 horas. A administração de insulina de mamífero durante 8 dias em *C. granulatus* aumentou significativamente a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e a captação de aminoácidos nas brânquias posteriores (Martins, 2003). No hepatopâncreas este hormônio também estimulou a captação de $^{14}\text{C}\text{-AIB}$, contudo não apresentou efeito significativo sobre a síntese de proteínas em hepatopâncreas, músculo, brânquias anteriores e posteriores. Esses dados sugerem a participação da insulina no processo de osmorregulação em *C. granulatus* (Martins, 2003).

O caranguejo *C. granulatus*, em função das excelentes adaptações às condições laboratoriais e da grande capacidade para enfrentar as variações de salinidade, de temperatura e de teor de oxigênio em seu habitat, é considerado um modelo biológico muito adequado para investigações sobre o controle do metabolismo intermediário em crustáceos. Tal afirmação, também pode ser observada nos estudos desenvolvidos por Kucharski (1990) sobre o metabolismo energético nesse caranguejo.

A partir dos resultados relatados em vertebrados e invertebrados nesta introdução, constituiu-se a hipótese deste trabalho que afirma a possível influência da

composição da dieta nas vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica em resposta ao jejum e a realimentação no caranguejo *C. granulatus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do jejum e da realimentação na capacidade gliconeogênica e neoglicogeniogênica do tecido muscular do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* alimentado com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas.

2.2 Específico

Investigar, *in vitro*, os efeitos do jejum de 15 dias e da subsequente realimentação por 72, 96 e 120 horas na formação de glicogênio e de glicose a partir do substrato marcado ^{14}C -lactato, no músculo mandibular do caranguejo *C. granulatus* submetido previamente à dieta rica em proteínas ou carboidratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Produtos utilizados

Cloreto de sódio (NaCl) p.a.: Merck; cloreto de potássio (KCl) p.a.: Synth; cloreto de magnésio (MgCl₂): Vetec; ácido bórico (H₃BO₃) p.a.: Synth; *N*-[2-*hidroxiethyl*]piperazine-*N'*-[2-*ethanesulfonic acid*] (Hepes): Sigma; cloreto de cálcio (CaCl₂): Vetec; Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PMSF): Sigma; L-lactato p.a.: Reagen; [U¹⁴C]L-lactato (154mCi/mmoL): Amershan Life Science; hidróxido de potássio (KOH) p.a.: Dinâmica; álcool etílico p.a.: Reagen; sulfato de sódio (Na₂SO₄) p.a.: Reagen; hidróxido de bário (Ba(OH₂)) p.a.: Merck; sulfato de zinco (ZnSO₄) p.a.: Merck; ácido clorídrico (HCl) p.a.: Merck; ácido tricloroacético (TCA) p.a.: Vetec; N-Butanol p.a.: Merck; ácido acético p.a.: Merck; albumina bovina: Sigma; solução padrão de glicose: Sigma; placas de alumínio com sílica gel 60G: MERK; anisaldeido: Merck; ácido sulfúrico concentrado p.a.: Merck; tolueno p.a.: Reagen; triton x-100: Vetec; *2,5-diphenyloxazole* (PPO): Sigma; *1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]benzene* (POPOP): Sigma.

3.2 Coleta e manutenção dos animais

Os caranguejos *C. granulatus* utilizados neste estudo foram capturados no município de Imbé, Rio Grande do Sul (29°58' latitude sul e 58°08' longitude oeste), numa região tipicamente estuarina composta tanto pelas águas oceânicas como pelo sistema lagunar de Tramandaí onde o nível das águas é influenciado pelos ventos e mares (Würdig, 1984; Bond-Buckup et al., 1991). Os caranguejos foram coletados e utilizados nos meses de verão dos anos de 2005 e 2006. As coletas foram realizadas manualmente nas tocas, na água ou no sedimento areno-lodoso próximo à vegetação e todos os animais utilizados no

experimento eram adultos, machos e em estágio C do ciclo de intermudas (Drach e Tchernigovtzeff, 1967).

O transporte dos animais, do local da coleta até o laboratório (cerca de 90 minutos), foi realizado em caixas plásticas contendo água do próprio local e, para evitar a fuga dos animais, uma grade metálica foi utilizada para cobrir a superfície da caixa. Após a chegada ao laboratório os animais eram imediatamente transferidos para uma caixa plástica contendo água destilada com aeração controlada. A realização desse procedimento, por um período de 24 horas, caracteriza um choque hiposmótico para o animal e é utilizado para eliminar possíveis parasitas e esvaziar parte do conteúdo intestinal (Kucharski, 1997). Ao término desse período, os caranguejos eram transferidos para um tanque maior, onde permaneciam por um período de sete dias para o processo de aclimação às condições do laboratório: temperatura constante de 25°C, fotoperíodo natural (ciclo claro:escuro), salinidade da água dos aquários de 20‰, aeração constante, alimentados, *ad libitum*, com carne bovina crua fatiada em pequenos cubos.

3.3 Procedimentos experimentais

Os animais aclimatados foram distribuídos em dois grupos: um recebeu uma dieta Rica em Proteínas (carne bovina crua), identificada como dieta HP e, ao outro foi oferecida uma dieta Rica em Carboidratos (arroz polido cozido), identificado como dieta HC. As duas dietas apresentaram valor calórico semelhante, conforme análise realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS (Tabela 1). As dietas foram oferecidas durante 15 dias. Esse período foi previamente determinado por Kucharski Da Silva (1991a) e influenciou de forma

significativa o metabolismo de carboidratos e lipídios de acordo com composição da dieta oferecida.

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas aos caranguejos. Valores referentes a 100g de alimento.

	Dieta HP (%)	Dieta HC (%)
Proteínas	21,59	3,34
Lipídios	6,71	0,45
Carboidratos	0,03	34,56
Fibras	0,31	0,30
Cinzas	0,03	0,02
Valor Calórico Total	146,87 kcal	155,65 kcal

Fonte: Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS

Após esse período de 15 dias, os animais foram divididos em três grupos: os *grupos de animais controle* – formado pelos caranguejos mantidos durante 15 dias com a dieta HC ou HP, os *grupos de animais em jejum* – constituído dos animais previamente alimentados com a dieta HP ou HC e submetidos durante 15 dias de jejum em gaiolas individuais ; os *grupos de animais realimentados ad libitum* constituídos pelos animais que retornavam à respectiva dieta oferecida anteriormente ao jejum. A realimentação foi realizada durante 72, 96 ou 120 horas. Diferentes períodos de jejum foram investigados por Vinagre e Da Silva (1992) que encontraram importantes alterações na manutenção da glicose e dos lipídios na hemolinfa, bem como nas concentrações teciduais de glicogênio e de lipídios durante o jejum de 15 dias em *C. granulatus*.

Os animais dos três grupos experimentais (controle - jejum - realimentação) foram submetidos à coleta da hemolinfa (0,2mL), nas articulações do primeiro ou do segundo pereiópodos, com a utilização de seringas contendo oxalato de potássio 10%. Para

análise do lactato houve processamento imediato da amostragem, enquanto para a dosagem da glicemia a hemolinfa era previamente congelada. Consecutivamente, no período da manhã, os animais passavam por processo de crioanestesia, durante dez minutos, para a extração do músculo mandibular encaminhado às experimentações.

3.4 Determinações bioquímicas

Determinação da concentração de glicose na hemolinfa

Os níveis de glicose na hemolinfa foram determinados pelo método enzimático da glicose-oxidase com o *Kit* Glicose ENZ-COLOR (Bio Diagnóstica Industria Clínica). A leitura das amostras foi realizada em e um aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) para leitura das amostras contra o branco do reagente em comprimento de onda a 505nm. Os resultados foram expressos em mmol/L.

Determinação da concentração de lactato na hemolinfa

A concentração do lactato na hemolinfa foi determinada com a utilização do *kit* para Ácido Láctico (r-biopharm–Roche). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 340nm e os resultados expressos em mmol/L.

Determinação da concentração de glicogênio no tecido muscular

O isolamento do glicogênio foi realizado segundo o método de Van Handel (1965). Após o sacrifício dos animais o músculo mandibular removido era conservado em

placas de Petry dispostas sobre gelo e contendo Solução Fisiológica de Caranguejo (SFC)² com osmolaridade semelhante a hemolinfa e acrescida de 1% de PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil). O tecido era pesado ($\pm 50\text{mg}$), posteriormente depositado em tubos cônicos de vidro, com capacidade para 10mL, contendo 2mL de KOH 30% e submetido à digestão em banho fervente durante 60 minutos. Para se obter a precipitação do glicogênio, foram adicionados aos tubos, Na_2SO_4 saturado e álcool etílico (92%) e, posteriormente, centrifugados por 10 minutos a 2700 rpm. O conteúdo de glicogênio foi dosado como glicose após a hidrólise ácida, como descrito por Geary; Langhans e Scharrer (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (*Kit* Glicose ENZ-COLOR). A leitura das amostras foi realizada num aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech), em comprimento de onda a 505nm. Os resultados foram expressos como glicogênio em gramas/100g de tecido úmido.

Dosagem de proteína no músculo mandibular

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976) e albumina bovina foi utilizada como padrão. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 595nm.

Determinação da gliconeogênese a partir de ¹⁴C-lactato

A concentração de lactato (20mM) utilizada nesse estudo foi escolhida conforme os estudos prévios que verificaram o efeito de diferentes concentrações de lactato não marcado na capacidade gliconeogênica hepatopancreática de *C. granulatus*, sendo verificado um aumento na formação de ¹⁴C-glicose na concentração de 20mM de

² Solução Fisiológica de Caranguejo (SFC): 350mM NaCl, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 8,8mM H₃BO₃, 10mM Hepes, 25mM CaCl₂, PH 7,8.

lactato, permanecendo estável em concentrações maiores (Oliveira; Da Silva, 1997). Esses mesmos autores determinaram 120 minutos como o melhor tempo de incubação para a síntese de glicose a partir U-¹⁴C-alanina no tecido hepatopancreático. Contudo, no presente trabalho, na investigação da síntese de glicose e de glicogênio no tecido muscular a partir de ¹⁴C-lactato, foi utilizado o período de incubação de 180 minutos.

Para a determinação da gliconeogênese, amostras do músculo mandibular dos caranguejos crioanestesiados ($\pm 50\text{mg}$) foram extraídas e ordenadas em placas de Petry mantidas sobre o gelo e umedecidas com SFC isosmótica à hemolinfa e acrescida de PMSF (1%). O tecido foi depositado em tubos com capacidade para 2ml contendo 500 μl de SFC, 0,2 μCi de [¹⁴C]L-lactato (Amershan Life Science: 5,70GBq/mmoL, 154mCi/mmoL) e 20mM de L-lactato não marcado. A seguir, os tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂ - 95:5 - v/v) durante 30 segundos, tampados e submetidos à incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff durante 180 minutos, com agitação constante e temperatura estabilizada em 25°C. Transcorrido esse período as reações teciduais foram interrompidas mediante imersão dos tubos em gelo e as amostras dos tecidos foram imediatamente processadas para determinação da neoglicogeniogênese. O meio de incubação foi centrifugado a 4000rpm durante 2 minutos e 300 μL do sobrenadante transferidos para tubos contendo 75 μL de Ba(OH)₂ saturado e 75 μL de ZnSO₄ a 2% para desproteínização (Somogyi, 1945). Na seqüência realizou-se nova centrifugação a 6000rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da gliconeogênese.

A determinação da ¹⁴C-glicose foi realizada por meio de cromatografia de camada delgada realizada em placas de alumínio com sílica gel 60G - MERK, conforme

método descrito por Baker; Huebotter e Schotz (1965) e adaptado por Oliveira e Da Silva (1997).

Como solução carreadora foi utilizada 200ml de uma mistura de solvente constituída de - N-butanol : álcool etílico 95% : ácido acético 5,4% - na proporção de 500 : 316 : 184 (v/v/v). A atmosfera da cuba utilizada era previamente saturada. O espaço disponível para o solvente correr na placa era limitado a uma extensão de 6cm a partir do ponto de origem, onde eram aplicadas as amostras. Nesse ponto foram aplicados 10 μ L da amostra juntamente com 10 μ L de solução padrão de glicose não marcada na concentração de 1,5mg/mL, 20 μ L dessa solução foram utilizados como controle. A glicose foi revelada nas placas de cromatografia com uma solução de - álcool etílico 95% : anisaldeído : ácido sulfúrico concentrado - na proporção de 18:1:1 (v/v/v). As bandas com aproximadamente 2cm eram recortadas e colocadas diretamente em frascos (*vial*) contendo 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. As amostras permaneciam refrigeradas em temperatura média de 4°C por um período de 24 horas. Após esse período a radioatividade foi avaliada através de um espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallace) calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram considerados como ^{14}C -lactato convertido em ^{14}C -glicose e expressos como nmoL.mg⁻¹ de proteína.tempo⁻¹ de incubação.

Determinação da neoglicogeniogênese a partir de ^{14}C -lactato

A determinação do ^{14}C -glicogênio seguiu o método descrito por Thomas; Schlender e Larner (1968) e posteriormente adaptado por Oliveira; Rossi e Da Silva (2001). As etapas iniciais que antecedem esse processo foram executadas nos procedimentos relacionados à determinação da gliconeogênese, onde, após o término do

período de incubação e o cessar da reação tecidual, as amostras foram encaminhadas à determinação do ^{14}C -glicogênio.

Os tecidos foram retirados dos tubos, lavados em dois frascos consecutivos contendo cada um 5ml de SFC resfriada, secos em papel filtro e submetidos à digestão com 100 μL de KOH (0,5N) em banho a 70°C durante 40 minutos. Após esse período, sucedeu-se a desproteinização e a neutralização do tecido com adição de 25 μL de HCl (1N) e 25 μL de TCA (30%). A seguir foi realizada uma centrifugação a 10000rpm durante 10 minutos e 30 μL do sobrenadante, de cada amostra, aplicado em tiras de papel Whatman 3MM. Essas tiras foram submetidas à imersão seqüencial por dois períodos (30 e 15 minutos) e em dois recipientes contendo álcool etílico (66%), promovendo assim, a precipitação do glicogênio. Posteriormente, as tiras foram secas em papel filtro e adicionadas em frascos (*vial*) contendo 3ml de líquido de cintilação que permaneceram por um período de 24 horas sob refrigeração (4°C). Um espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac) calibrado com uma curva de correção para DPM foi utilizado para estimar a radioatividade. Os resultados foram concluídos como ^{14}C -lactato convertido em glicogênio e expressos como pmoL.mg^{-1} de proteína. tempo^{-1} de incubação.

3.5 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão da média (Média \pm DPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Dos dados obtidos, para a comparação entre os grupos de dieta semelhante foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) ou de duas vias para comparação entre dietas distintas e acompanhados pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As

análises foram realizadas com o programa SigmaStat 2.0 (Jandel *Corporation*) compatível com Windows.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, C.E.; TYLER, P.A.; VARNEY, M.S. Lipid profiles of *Nematocarcinus gracilis* a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. **Hydrobiologia**, v. 440, n. 1-3, p. 273, 279, 2000.
- BAKER, N.; HUEBOTTER, R.J.; SCHOTZ, M.C. Analysis of glucose-¹⁴C in tissues using thin-layer chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p. 227-235, 1965.
- BERGSTRÖM, J.; HERMANSEN, L.; HULTMAN, E. SALTIN, B. Diet, muscle glycogen and physical performance. **Acta Physiol. Scand.** v. 71, p. 140- 150, 1967.
- BOND-BUCKUP, G.; FONTOURA, N.F.; MARRONI, N.P.; KUCHARSKI, L.C.R. **O Caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia.** Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1991.
- BOTTO, J.L.; IRIGOYEN, H.P.. Biecológia de la comunidad del cangrejal contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. **Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur.** UNESCO, Montevideo, Uruguay, p. 161-169, 1980.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72 p. 248-254, 1976
- BROMBERG, E. 1992. **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão.** Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande. Rio Grande, 1992.
- CALDER, P.; GEDDES, R. Heterogeneity of glycogen synthesis upon refeeding following starvation. **Int. J. Biochem.**, v. 24, n. 1, p. 71-77, 1992.
- CHANG, E.; O'CONNORS, J.D. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: BLISS, D.E. **The Biology of Crustacea.** Academic Press, New York, p. 263-289, 1983.
- CHITTÓ, A.L.F. 90f. **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico e hiperosmótico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas:Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.
- CHITTÓ, A.L.F.; 2005. 118f. **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

CORSSMIT, E.P.M.; ROMIJN, J.A.; SAWERWEIN, H.P. Regulation of glucose production with special attention to non-classical regulatory mechanisms: a review. **Metab. Clin. Exp.**, v. 50, p. 742-755, 2001.

CUESTA, J.A.; DIESEL, R.; SCHUBART, C.D. Re-examination of zoeal morphology of *Chasmagnathus granulatus*, *Cyclograpsus lavauxi*, *Hemigrapsus sexdentatus*, and *H. crenulatus* confirms consistent chaetotaxy in the Varunidae (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v. 74, n. 9, p. 895-912, 2001.

D'INCAO, F.; RUFFINO, M.L.; SILVA, K.G. Notas preliminares sobre a ecologia de *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Resumos XV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Curitiba, 1988.

D'INCAO, F.; RUFFINO, M.L.; SILVA, K.G.; BRAGA, A.C. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) na barra de Rio Grande, RS **Atlântida**, v. 12 (2), p. 85-93, 1990.

DA SILVA, R.S.M.; KUCHARSKI, L.C.R. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 101A, n. 3, p. 631-634, 1992.

DA SILVA, R.S.M.; MIGLIORINI, R.H. Effects of starvation and refeeding on energy-linked metabolic processes in the turtle (*Phrynops hilarii*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 96A, n. 3, p. 415-419, 1990.

DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4 ed. Tradução de Yara M. Michelacci. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1998.

DRACH, F. TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu**, v.161, p. 595-607, 1967.

GARCIA, F.; GONZALEZ-BARO, M.; POLLERO, A. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borelli*. **Lipids**, v. 37, n. 6, p. 581-585, 2002.

GEARY, N.; LANGHANS, W.; SCHARRER, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression os feeding in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 241, n. 10, p. R330-335, 1981.

GILBERT, L.I.; O'CONNOR, J.D. Lipid metabolism and transport in arthropods. In: FLORKIN, M; SCHERR, B.T. **Chemical Zoology**, New York, Academic Press, p. 229-254, 1970.

GILLES, R. Compensatory organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117A, p. 279-290, 1997.

GILLES, R. Osmoregulatory process in mollucs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, v. 6, p. 1-36, 1982.

HABOLD, C.; FOLTZER-JOURDAINNE, C.; Le MAHO, Y.; LIGNOT, J-H.; OUDART, H. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. **J. Physiol.** v. 566, p. 575-586, 2005.

HARTNOLL, R.G. Evolution, systematics and geographical distribution. In: BURGGREN, W.; MCMOHAN, B. **Biology of Land Crabs**. New York: Cambridge University Press, 1988. p. 6-54.

HENRY, R.P.; BOOTH, C.E.; LALLIER, F.H.; WALSH, P.J. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. **J. Exp. Biol.** v. 186, p. 215-234, 1994.

HERMANSEN, L.; VAAGE, O. Lactate disappearance and glycogen synthesis in human muscle after maximal exercise. **Am. J. Physiol.** v. 233, n. 5, p. E422-429, 1977.

HERREID, C.F.; FULL, R.J. Energetics and locomotion. In: MACMAHON, B. **Biology of Land Crabs**. Cambridge University Press, Cambridge, 1988. p. 337-377.

HERVANT, F. The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hypogean and epigeal crustaceans. **C. R. Acad. Sci. Paris (Série III)** v. 319, p. 1071-1077, 1996.

HERVANT, F.; MATHIEU, J.; BARRE, H.; SIMON, K.; PINON, C. Comparative study on the behavioral, ventilatory and respiratory responses of hypogean and epigeal crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A, p. 1277-1283, 1997.

HERVANT, F.; MATHIEU, J.; BARRE, H. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding. **J. Exp. Biology.**, v. 202, p. 3587-3595, 1999.

HERVANT, F.; RENAULT, D. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigeal isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 2079-2087, 2002.

HILL, A.D.; TAYLOR, A.C.; STRANG, R.H.C. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* during environmental anoxia and subsequent recovery. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 150, p. 31-50, 1991.

HOCHACHKA, P.W.; SOMERO, G.N.; SCHNEIDER, D.E.; FREED, J.M. The organization and control of metabolism in the crustacean gill. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 33, p. 529-548, 1970.

HUGGINS, A.K.; MUNDAY, K.A. Crustacean metabolism. **Adv. Comp. Physiol. Biochem.**, v. 3, p. 271-376, 1968.

JOHNSTON, M.A.; DAVIES, P.S. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 41B, p. 433-443, 1973.

KRAUS-FRIEDMANN, N.K. Hormonal regulation of gluconeogenesis. **Physiological Reviews**, v. 64, n. 1, p. 170-255, 1984.

KUCHARSKI, L.C.; RIBEIRO, M.F.; SCHEIN, V.; DA SILVA, R.S.M.; MARQUES, M. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **J. Exp. Zool.**, v. 279, p. 118-125, 1997.

KUCHARSKI, L.C.R, SCHEIN, V.; CAPP, E.; DA SILVA, R.S.M. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 125, p. 256-263, 2002.

KUCHARSKI, L.C.R. 1990. **Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

KUCHARSKI, L.C.R. 1997. **Insulina: presença de receptores e efeito biológico em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas:Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

KUCHARSKI, L.C.R.; CAPP, E.; CHITTÓ, A.L.F.; TRAPP, M.; DA SILVA, R.S.M.; MARQUES, M. Insulin signaling: Tyrosina kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. **J. Exp. Zool.**, v. 283, p. 91-94, 1999.

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

KUCHARSKI, L.C.R.; DA SILVA, R.S.M. Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100A (3), p. 599-602, 1991b.

LALLIER, F.H.; WALSH, P.J. Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bul. Marine. Science**, v. 48, n. 3, p. 665-669, 1991.

LALLIER, F.H.; WALSH, P.J. Metabolism of isolated hepatopancreas cells from the blue-crab (*Callinectes sapidus*) under simulated postexercise and hypoxic conditions. **Physiol. Zool.**, v. 65, p. 712-723, 1992.

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

MACHADO, C.R.; GAROFALO, M.A.R.; ROSELINO, J.E.S.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Effects of starvation, refeeding, and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 71, p. 429-437, 1988.

- MAÑE-GARZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B.H.; LEYMONTE, J. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. In: Osmoregulación frente a cambios de la salinidad. **Physis.**, Buenos Aires, v. 33A, p.163-171, 1974.
- MANTEL, L.H.; FARMER, L.L. Osmotic and ionic regulation. In: BLISS, E.; MANTEL, L.H. **The biology of crustacean**. London: Academic Press. v. 5, p. 53-161, 1983.
- MARTINS, H. 2003. **Efeito da insulina sobre a atividade da enzima Na⁺-K⁺ ATPase branquial, a síntese de proteínas e captação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas:Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- MIGLIORINI, R.H.; LINDEN, C.; MOURA, J.L.; VEIGA, J.A.S. Gluconeogenesis in a carnivorous bird (black vulture). **Am J. Physiol.** v. 225, p. 1389-1392, 1973.
- MITHIEUX, G.; BADY, I.; GAUTIER, A.; CROSET, M.; RAJAS, F.; ZITOUN, C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286, p. E370-375, 2004.
- MODARESSI, S.; BRECHTEL, K.; CHRIST, B.; JUNGERMANN, K. Human mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 gene. **Biochem. J.**, v. 333, p. 359-366, 1998.
- MOON, T.W. Adaptation, constraint, and the function of the glyconeogenic pathway. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 1059-1068, 1988.
- MORRIS, S.; AIRRIESS, C.N. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. **S. Afr. J. Zool.** v. 33, p. 87-106, 1998.
- NERY, L.E.M.; SANTOS, E.A. Carbohydrate metabolism during osmorregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106B, p. 747-753, 1993.
- NEWGARD, C.B.; MOORE, S.V.; FOSTER, D.W.; McGARRY, J.D. Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. **J. Biol. Chemistry**, v. 259, n. 11, p. 6958-6963, 1984.
- NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. **Biochemistry for the medical sciences**. New York: John Wiley & Sons, 1983.
- ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1985.
- OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A, n. 4, p. 1429-1435, 1997.

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

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

OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C.; KUCHARSKI L.C.; DA SILVA R.S.M. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.137A, p. 383-390, 2004.

PANSERAT, S.; PLAGNES-JUAN, E.; BREQUE, J.; KAUSHIK, S. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxikinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, v. 204, n. 2, p. 359-365, 2001.

PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ZENTENO, E.; CUZON, G.; GABRIELA, G.; BRITO, R.; GELABERT, R.; HIDALGO, E.; ROSAS, C. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 251, p. 416-429, 2006.

ROBERTSON, J.D.; COWEY, C.B.; LEAF, G. The free amino acids in muscle as three marine invertebrates *Nephrops norvegicus* (L) and *Eledone cirrhosa* (Lamarck). **Comp. Biochem. physiol.**, v. 101A, n. 3, p. 545-548, 1992.

SANTOS, E.A.; NERY, L.E.M. Blood glucose regulation in a estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1981) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 87A, p. 1033-1035, 1987.

SANTOS, E.A; BALDISSEROTO, B.; BIANCHINI, A.; COLARES, E.P.; NERY, L.E.M.; MANZONI, G.C. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 88A, n. 1, p. 21-25, 1987.

SARTORI, D.R.S.; GAROFALO, M.A.R.; ROSELINO, J.E.S.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Gluconeogenesis and P-enolpyruvate carboxykinase in liver and kidney of long-term fasted quails. **J. Comp. Physiol.**, v. 170B, p. 372-377, 2000.

SCHEIN, V. 1999. 114f. **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.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

SCHEIN, V.; CHITTÓ, A.L.F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C., WORMHOUDT, A.V.; DA SILVA, R.S.M. Effect of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140B, p. 561-567. 2005b.

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

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

SHULMAN, G.I.; LANDAU, B.R. Pathways of glycogen repletion. **Physiol. Reviews**, v. 72, n. 4. p. 1019-1035, 1992.

SOMMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal Biol. Chem.**, v. 160, p. 69-73, 1945.

SUGDEN, M.C.; HOLNESS, M.J.; PALMER, N.T. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. **Biochem. J.**, v. 263, p. 313-323, 1989.

SURHOLT, B.; NEWSHOLME, E. Maximum activities and properties of glucose-6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, v. 198. p. 621-629, 1981.

THABREW, M.I.; POAT, P.C.; MUNDAY, K.A. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 40B, p. 531-541, 1971.

THOMAS, G.A.; SCHLENDER, K.K.; LARNER, J. A rapid filter paper assay for UDP-glucose glucosyl-transferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 489-499, 1968.

TRAPP, M. 2005. 156f. **Efeitos do estresse hipo e hiperosmótico sobre as características do receptor à insulina e sobre a captação de glicose em brânquias do caranguejo *C. granulatus***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

TRAPP, M. ; SCHEIN, V. ; WACHE, Y. ; FAVREL, P.; CAPP, E.; KUCHARSKI, L.C.; WORMHOUDT, A.V.; DA SILVA, R.S.M. Tyrosine kinase activity of the insulin receptor from *Chasmagnathus granulata* gills and partial cloning of insulin receptor gene. **European Comparative Endocrinologists**, ed. 21º, p. 375-379, 2002.

TURCATO, G.S. 1990. **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil**. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.

VAN AARDT, W.J. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 91A, p. 299-304, 1988.

VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt. Biochem.**, v. 11, p. 256-265, 1965.

VINAGRE, A.S., 1999. 152f. **Metabolismo de carboidatos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: efeito do jejum e da realimentação e da apedunculção sobre a adaptação ao estresse hiposmótico.** Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

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

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

WALSH, P.J.; HENRY, R.P. Activities of metabolic enzymes in the deep-water crabs *Chaceon fenneri* and *C. quinquendens* and the shallow-water crab *Callinectes sapidus*. **Marine Biology**, v. 106, p. 342-346, 1990.

WATFORD, M.; HOD, Y.; CHIAO, Y.B.; UTTER, M.F.; HANSON, R.W. The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 10023-27, 1981.

WÜRDIG, N.L., 1984. **Ostracodes do sistema lagunar de Tramandaí, RS, Brasil, sistemática, ecologia e subsídios à paleoecologia.** Tese (Doutorado em Paleontologia) – Curso de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

XAVIER, A.R.; ROSELINO, J.E.S.; RESANO, N.M.Z.; GAROFALO, M.A.R.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Glyconeogenic pathway in isolated skeletal muscles of rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, p. 164-169, 2002.

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

4. ARTIGO CIENTÍFICO³

³ As próximas páginas complementam essa dissertação e serão formatadas para publicação no periódico: *Journal of Comparative Physiology B – Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, Springer, Berlin Heidelberg. Instruções para publicação, ver Anexo 1.

Efeito do jejum e da realimentação sobre a gliconeogênese e a neoglicogeniogênese no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido previamente à dieta rica em proteínas ou carboidratos

Ricardo Pellegrino, Luiz Carlos Kucharski, Roselis Silveira Martins da Silva

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

Endereço para correspondência:

Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Rua Sarmento Leite, 500 - 2º andar

90050-170 – Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: +55 51 3316-3623 Fax: +55 51 3316-3656

e-mail: roselis@ufrgs.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de investigar, *in vitro*, o efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicogênio em músculo mandibular de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* previamente alimentados com dieta rica em carboidratos ou proteínas. Além disso, nas mesmas condições experimentais, foram determinadas as concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa e de glicogênio no músculo mandibular.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o *C. granulatus* é um caranguejo adaptado ao jejum mantendo a homeostase metabólica. Contudo, o padrão metabólico de adaptação ao jejum utiliza diferentes vias segundo a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo. Durante o jejum a capacidade gliconeogênica reduz em caranguejos mantidos com a dieta HC. Contudo, em animais mantidos com a dieta HP um aumento na atividade da via neoglicogeniogênica é constatado após 15 dias de jejum.

Em caranguejos alimentados com a dieta HP as vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica estariam envolvidas na redução dos valores de lactato no período de realimentação. Entretanto, nos animais mantidos com a dieta HC estas vias seriam responsáveis pela manutenção dos níveis de lactato no estado alimentado.

PALAVRAS-CHAVE: Jejum, realimentação, gliconeogênese, músculo, dieta.

INTRODUÇÃO

O *C. granulatus* é uma espécie onívora-detritívora, que habita estuários neotropicais a partir do estado do Rio de Janeiro no Brasil até o Golfo de San Martín na Argentina (Turcato, 1990; Bond-Buckup et al., 1991).

O hábito alimentar oportunista foi caracterizado através de análise do conteúdo estomacal, no qual foi constatado a presença de sedimentos e de restos de origem vegetal e animal (D’Incao et al., 1990). Eventualmente, comporta-se como canibalista, atacando suas próprias comunidades (Botto; Irigoyen, 1980).

Vinagre e Da Silva (1992) verificaram em *C. granulatus*, previamente alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC), que os níveis de glicose hemolinfática diminuíram progressivamente nas duas primeiras semanas de jejum, permanecendo estáveis até o final do período experimental. Nos animais alimentados com uma dieta rica em proteínas (HP), os valores de glicose hemolinfática não apresentaram alterações significativas, permanecendo estáveis após três semanas de jejum. Em outro crustáceo, no camarão *Litopenaeus vannamei*, Pascual et al. (2006) verificaram que a composição da dieta previamente oferecida ao animal modifica a resposta metabólica durante a restrição alimentar.

Oliveira et al. (2004), estudando o efeito de diferentes tempos de jejum sobre a capacidade de conversão de ^{14}C -alanina ou ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose no hepatopâncreas de *C. granulatus*, verificaram que os animais previamente alimentados com a dieta HP, apresentavam no terceiro dia de jejum, uma redução na capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -alanina. Contudo, aos 15 dias de restrição alimentar, a

gliconeogênese a partir de ^{14}C -alanina aumentou significativamente em relação aos valores iniciais, para novamente diminuir aos 21 dias de jejum. Já a conversão do ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose não apresentou alteração em relação aos valores iniciais. Esses resultados demonstram a participação da via gliconeogênica hepatopancreática na manutenção da homeostase metabólica durante diferentes períodos de jejum em *C. granulatus*.

Recentemente, Schein et al. (2005a) demonstraram a presença da via gliconeogênica no músculo mandibular de *C. granulatus*. A gliconeogênese e a atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, E.C. 4.1.1.32) muscular apresentam uma variação sazonal: durante o inverno as atividades da via e da PEPCK mitocondrial e a expressão da enzima estão bastante reduzidas, sendo a atividade da enzima dividida igualmente entre as frações citosólicas e mitocondrial. Por outro lado, no verão 85% da atividade da PEPCK encontra-se na fração mitocondrial (Schein et al., 2005a). Recentemente, foi verificado no músculo mandibular de *C. granulatus* atividade da enzima glicose-6-fosfatase (G6Fase, E.C. 3.1.3.9), demonstrando que a via gliconeogênica nesse tecido seria completa (Chittó, 2005).

O processo conhecido como neoglicogeniogênese consiste na síntese de glicogênio a partir de substratos que não sejam carboidratos, em especial o lactato (Newsholme; Leech, 1983). Em músculo de rato, foi demonstrado que a via neoglicogeniogênica não utiliza a enzima PEPCK, mas uma possível inversão do fluxo metabólico da reação catalisada pela enzima piruvato quinase que levaria à síntese de glicogênio a partir de $[\text{U}^{14}\text{C}]\text{L-lactato}$ (Xavier et al., 2002). Em músculo de ratos a atividade da PEPCK é muito baixa e encontra-se na ordem de 10^{-12} molar (Xavier et al., 2002). Já no músculo de *C. granulatus* a atividade da PEPCK está na ordem de 10^{-9} molar, sendo que 90% dessa atividade acham-se na fração mitocondrial (Schein et al., 2004).

A realimentação após períodos de restrição alimentar pode ser definida como sendo um estado nutricional transitório, com características distintas tanto do jejum como do período de absorção e pode ser considerada como um “estado de histeria metabólica”, onde os processos de síntese são reativados, porém de forma demorada ou exacerbada (Sugden et al., 1989). Estudos com diferentes espécies de crustáceos demonstram grande diversidade na estratégia metabólica utilizada durante a realimentação. Em *Gammarus fossarum*, o período de sete dias de realimentação promoveu recuperação parcial das reservas energéticas exauridas durante o jejum. Já nos anfípodes *Niphargus virei* e *Niphargus rhenorhodanensis* uma plena recuperação das reservas foi estabelecida somente após quinze dias de realimentação (Hervant et al., 1999). Foi demonstrado que o jejum de três semanas diminuiu a síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -glicina no músculo de *C. granulatus*, contudo, após o período de realimentação por 48 horas, esses valores se assemelhavam àqueles do grupo alimentado (Vinagre; Da Silva, 2002).

O objetivo deste trabalho foi de investigar, *in vitro*, o efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicogênio em músculo mandibular de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* previamente alimentados com dieta rica em carboidratos ou proteínas. Além disso, nas mesmas condições experimentais, foram determinadas as concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa e de glicogênio no músculo mandibular.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Os Caranguejos *C. granulatus* utilizados neste experimento foram capturados na lagoa Tramandaí – RS – Brasil (29°58' latitude sul e 58°08' longitude oeste), em uma região tipicamente estuarina (Bond-Buckup et al., 1991). As coletas foram realizadas manualmente nas tocas, na água ou no sedimento areno-lodoso próximo à vegetação. Todos os animais utilizados no experimento eram adultos machos e no estágio C do ciclo de intermudas (Drach; Tchernigovtzeff, 1967).

No laboratório, os animais foram aclimatados durante uma semana em aquários com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, aeração constante; fotoperíodo natural (ciclo claro:escuro) e alimentados, *ad libitum*, com carne bovina crua fatiada antes dos procedimentos experimentais.

Procedimentos experimentais

Os animais aclimatados foram distribuídos em dois aquários onde receberam a dieta rica em proteínas (carne bovina crua – HP) ou carboidratos (arroz cozido – HC) por um período de 15 dias. As duas dietas apresentaram valor calórico semelhante, conforme análise realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS (Tabela 1).

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas aos caranguejos. Valores referentes a 100g de alimento.

	Dieta HP (%)	Dieta HC (%)
Proteínas	21,59	3,34
Lipídios	6,71	0,45
Carboidratos	0,03	34,56
Fibras	0,31	0,30
Cinzas	0,03	0,02
Valor Calórico Total	146,87 kcal	155,65 kcal

Instituto de Tecnologia de Alimentos/UFRGS

Após esse período de 15 dias, os animais foram divididos em grupos: o *grupo de animais controle* (n = 41) – formado pelos caranguejos retirados dos aquários e encaminhados aos procedimentos experimentais, e o *grupo de animais em jejum* (n = 29) – constituído dos animais que foram isolados em gaiolas individuais e que permaneceram sem alimento durante 15 dias e o *grupo de animais realimentados* (n = 88) – formado pelos animais submetidos aos 15 dias de jejum e realimentados, *ad libitum*, com a respectiva dieta previamente oferecida, por 72, 96 ou 120 horas.

Todos os caranguejos (controle - jejum - realimentados) foram submetidos, no período da manhã, à coleta de hemolinfa (0,2mL) nas articulações do primeiro ou do segundo pereiópodos com a utilização de seringas contendo oxalato de potássio a 10%. A seguir, os animais foram crioanestesiados, por um período de dez minutos, para a retirada do músculo mandibular encaminhado aos procedimentos experimentais.

Determinações bioquímicas

A concentração de glicose hemolinfática foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase com o *Kit* Glicose ENZ-COLOR (Bio Diagnóstica Industria Clínica). Os resultados foram expressos em mmol/L.

A concentração do lactato foi determinada com a utilização do *kit* para Ácido Láctico (r-biopharm–Roche), e os resultados expressos em mmol/L.

O isolamento do glicogênio foi realizado segundo o método de Van Handel (1965). A concentração de glicogênio foi determinada como glicose após a hidrólise ácida como descrito por Geary et al. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (*Kit* Glicose ENZ-COLOR) e os resultados foram expressos em gramas de glicogênio/100g de tecido úmido.

Para a dosagem de proteínas, utilizou-se o método de Bradford (1976) com albumina bovina como padrão.

Para a determinação da gliconeogênese e neoglicogeniogênese, amostras do músculo (50mg) foram incubadas em 500µl de Solução Fisiológica de Caranguejo - SFC (350mM NaCl, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 8,8mM H₃BO₃, 10mM Hepes, 25mM CaCl₂, pH 7,8), 0,2µCi de [U¹⁴C]L-lactato (Amershan Life Science: 5,70GBq/mmol, 154mCi/mmol) e 20mM de L-lactato, a fase gasosa foi substituída por carbogênio (O₂:CO₂ - 95:5 - v/v) e incubadas em banho metabólico durante 180 minutos, sob agitação constante e temperatura de 25°C. Transcorrido esse período de tempo, as reações teciduais foram interrompidas mediante imersão dos tubos em gelo e as amostras dos tecidos,

imediatamente processadas para determinação de ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicogênio. Para a determinação da ^{14}C -glicose, o meio de incubação foi centrifugado a 4000rpm durante 2 minutos e 300 μL do sobrenadante transferidos para tubos contendo 75 μL de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ saturado e 75 μL de ZnSO_4 a 2% para desproteinização (Sommogy, 1945). Na seqüência realizou-se nova centrifugação a 6000rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinação da ^{14}C -glicose por meio de cromatografia de camada delgada realizada em placas de alumínio com sílica gel 60G - MERK, conforme método descrito por Baker et al. (1965) e adaptado por Oliveira e Da Silva (1997). Os resultados foram expressos como nmol ^{14}C -lactato convertido em glicose. mg^{-1} de proteína. tempo^{-1} de incubação.

A determinação do ^{14}C -glicogênio seguiu o método descrito por Thomas et al. (1968) e posteriormente adaptado por Oliveira et al. (2001). Os resultados foram expressos como pmol ^{14}C -lactato convertido em glicogênio. mg^{-1} de proteína. tempo^{-1} de incubação.

Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão da média (Média \pm DPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Dos dados obtidos, utilizou-se análise de variância de uma via (ANOVA) ou de duas vias acompanhadas pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As análises foram realizadas com o programa SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation) compatível com Windows.

RESULTADOS

Como pode ser observado na tabela 2, a concentração de glicose hemolinfática, durante o jejum, nos animais alimentados com dieta HC diminuiu 62,3% ($p<0,05$) em relação ao grupo controle, mas após 72 horas de realimentação aumentou 3 e 8 vezes ($p<0,05$) quando comparada àquelas dos grupos controle e jejum, respectivamente. Ao final do período de realimentação (120h) os valores de glicose na hemolinfa eram semelhantes àqueles dos animais do grupo controle.

Tabela 2. Efeito do jejum e da realimentação sobre a concentração de glicose e de lactato na hemolinfa e de glicogênio no músculo mandibular de *C. granulatus* submetido previamente à dieta HC ou HP.

	GLICOSE mmol/L		LACTATO mmol/L		GLICOGÊNIO gramas %	
	HC	HP	HC	HP	HC	HP
CONTROLE	1,22 ± 0,21 ** (10)	0,40 ± 0,12 (10)	2,19 ± 0,71 * (3)	0,54 ± 0,38 (3)	1,84 ± 0,78 ** (5)	0,39 ± 0,19 (6)
JEJUM	0,46 ± 0,15 a (10)	0,36 ± 0,07 (8)	0,74 ± 0,13 a * (3)	1,50 ± 0,43 a (3)	1,00 ± 0,52 * (4)	0,38 ± 0,20 (6)
R72h	3,63 ± 0,95 a,b ** (10)	0,45 ± 0,07 (16)	1,70 ± 0,43 b * (3)	0,54 ± 0,27 b (3)	1,57 ± 0,56 ** (4)	0,75 ± 0,19 a,b (7)
R96h	2,74 ± 1,69 a,b,c * (4)	0,20 ± 0,04 a,b,c (4)	1,76 ± 0,58 b * (3)	0,53 ± 0,15 b (3)	1,70 ± 0,45 ** (5)	0,39 ± 0,10 c (5)
R120h	1,65 ± 0,32 b,c,d ** (4)	0,75 ± 0,14 a,b,c,d (5)	1,51 ± 0,54 (3)	0,87 ± 0,17 b (3)	1,78 ± 0,56 ** (5)	0,49 ± 0,12 c (5)

Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão; (): número de animais; *: diferença entre dietas ($p<0,05$); **: ($p<0,01$); a: diferença em relação ao grupo controle ($p<0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p<0,05$); c: diferença em relação ao grupo R72h ($p<0,05$); d: diferença em relação ao grupo R96h ($p<0,05$).

Nos animais alimentados com dieta HP, os valores de glicose na hemolinfa não sofreram variações significativas após 15 dias de jejum. A realimentação por 72 horas não alterou significativamente a concentração de glicose hemolinfática. Contudo, 96 horas de realimentação diminuíram significativamente ($p<0,05$) os valores de glicose quando

comparados aos grupos controle, jejum e realimentado por 72 horas. Ao final do período de 120 horas de realimentação a concentração de glicose hemolinfática aumentou ($p < 0,05$) em relação a todos os outros grupos (Tabela 2).

Na comparação entre as dietas, os animais previamente alimentados com a dieta HC apresentaram valores de glicose na hemolinfa significativamente ($p < 0,01$) mais elevados que aqueles constatados no controle e realimentação (Tabela 2).

Os animais previamente alimentados com dieta HC não sofreram alterações significativas ($p > 0,05$) nos valores de lactato hemolinfático após os períodos de jejum e de realimentação. Contudo, a restrição alimentar reduziu em 66,21% os valores de lactato na hemolinfa quando comparados àqueles do grupo controle (Tabela 2).

Nos animais do grupo HP, o jejum aumentou significativamente ($p < 0,05$) os níveis de lactato hemolinfático. Contudo, após o período de 72 horas de realimentação, os níveis de lactato na hemolinfa retornaram aos valores do grupo controle e assim permaneceram até às 120 horas de realimentação (Tabela 2).

Nos animais controle alimentados com a dieta HC os valores de lactato hemolinfático foram 4 vezes maiores que aqueles constatados no grupo que recebeu a dieta HP. Porém, nos animais submetidos à dieta HP, o jejum de 15 dias promoveu uma inversão significativa nesse quadro, com um aumento de 177,78% ($p < 0,05$) nos valores de lactato hemolinfático. Somente no período de 120 horas de realimentação não foi constatada diferença significativa nos níveis de lactato entre as dietas (Tabela 2).

Após os períodos de jejum e de realimentação não foram observadas alterações significativas no conteúdo de glicogênio muscular nos animais do grupo HC.

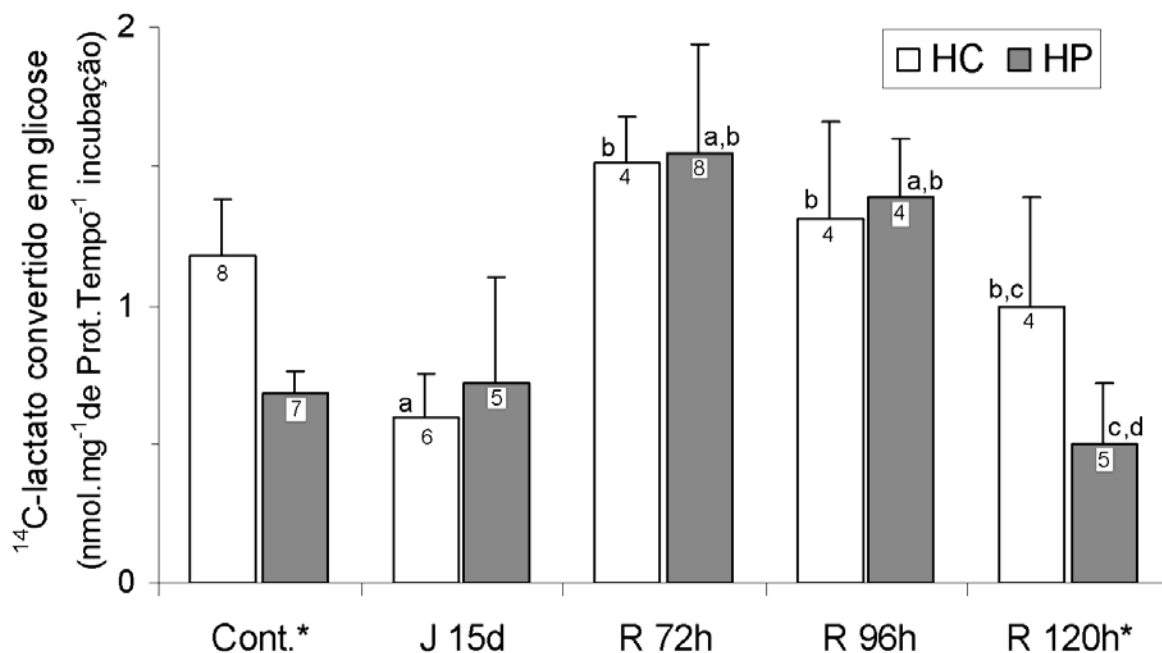
Contudo, uma diminuição de 45,65% ($p > 0,05$) na concentração de glicogênio muscular foi verificada no grupo jejum quando comparada àquela do grupo controle (Tabela 2).

Nos animais alimentados com dieta HP, as reservas de glicogênio muscular não foram afetadas pelo jejum, mas após 72 horas de realimentação constatou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos valores dos grupos controle e jejum. Na realimentação por 96 e 120 horas os valores de glicogênio muscular retornaram a níveis semelhantes àqueles dos grupos controle e jejum (Tabela 2).

O grupo controle submetido à dieta HC apresentou valores de glicogênio muscular 4,72 vezes maiores ($p < 0,01$) que os verificados no grupo controle HP. Após o período de jejum, essa diferença diminuiu para 2,63 vezes ($p < 0,05$). Na realimentação por 96 e 120 horas os valores de glicogênio muscular retornaram a níveis semelhantes àqueles do grupo controle (Tabela 2).

Como pode ser observado na figura 1, nos animais previamente alimentados com dieta HC, após o jejum de 15 dias, ocorreu uma diminuição significativa de 50% nos níveis de formação de ^{14}C -glicose a partir do ^{14}C -lactato. Durante a realimentação, esses valores foram rapidamente restabelecidos aos valores do grupo controle.

Figura 1. Efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose (gliconeogênese) no músculo mandibular de *C. granulatus* alimentado previamente com dieta HC ou HP.



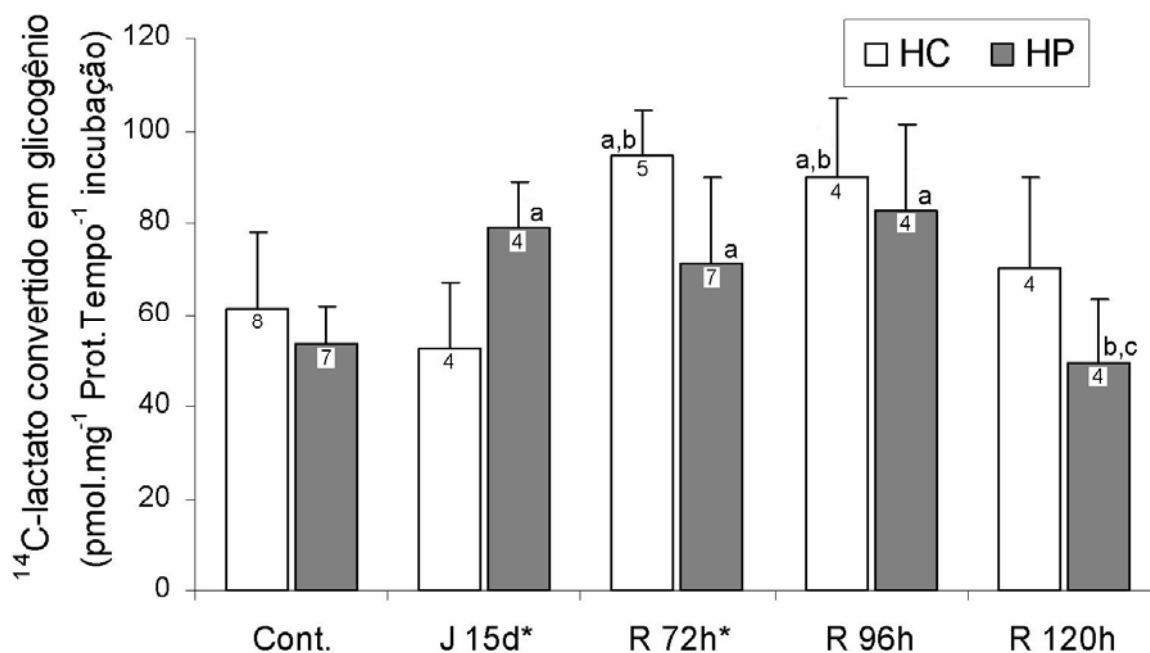
Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R 72h ($p < 0,05$); d: diferença em relação ao grupo R 96h ($p < 0,05$); Cont*: diferença entre dietas ($p < 0,01$); R 120h*: ($p < 0,05$).

Nos animais do grupo HP, o jejum não alterou significativamente ($p > 0,05$) os níveis de formação de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato. Durante o processo de realimentação, por 72 e 96 horas, foi constatado um aumento significativo ($p < 0,05$) na síntese de ^{14}C -glicose a partir da ^{14}C -lactato. Contudo após 120 horas de realimentação a síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato retornou aos valores do grupo controle.

Nos grupos controle ($p < 0,01$) e realimentado por 120 horas com a dieta HC, a atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato foi cerca de 2 vezes maior ($p < 0,05$) que no grupo de caranguejos submetido à dieta HP.

Como pode ser observado na figura 2, os animais que receberam dieta HC não apresentaram alterações significativas nos níveis de formação de ^{14}C -glicogênio após o jejum. Contudo, a realimentação por 72 e 96 horas no grupo HC aumentou a atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato no músculo em 52% e 46% ($p < 0,05$), respectivamente, quando comparada ao grupo controle. Após o período de 120 horas de realimentação, a formação de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -lactato retornou aos valores do grupo controle.

Figura 2. Efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicogênio no músculo mandibular de *C. granulatus* alimentado previamente com dieta HC ou HP.



Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R 96h; ($p < 0,05$); * diferença entre dietas ($p < 0,05$).

Nos animais HP, após o período de jejum, foi identificado um aumento significativo de 47,80% na formação de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -lactato no músculo mandibular. Os valores permaneceram significativamente elevados durante os períodos de

72 e 96 horas de realimentação com a dieta HP. Após 120 horas de realimentação com a dieta HP os valores de formação de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato retornaram aos níveis do grupo controle.

Não foi constatada diferença significativa na formação de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -lactato no músculo mandibular entre os caranguejos submetidos à dieta HC e aqueles alimentados com a dieta HP.

DISCUSSÃO

Em músculo mandibular de *C. granulatus*, os resultados demonstram que a composição da dieta prévia exerce um papel sobre o padrão de resposta metabólica ao jejum e aos diferentes tempos de realimentação. Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram a influência da composição da dieta sobre a regulação das reservas de carboidratos e lipídios e a utilização das mesmas durante o jejum (Vinagre e Da Silva, 1992; Oliveira et al., 2004). Em caranguejos alimentados previamente com a dieta HP as respostas das vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica do músculo mandibular, durante o jejum e em diferentes períodos de realimentação estudados, contrastam com aquelas observadas nos caranguejos mantidos com a dieta HC. Também as reservas de glicogênio muscular e as concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa são significativamente diferentes entre os animais alimentados com a dieta HP e aqueles submetidos à dieta HC.

Contrariamente ao que ocorre em fígado de vertebrados (Moon, 1988), em músculo mandibular a capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato é significativamente maior nos animais alimentados com a dieta HC quando comparada àquela verificada em caranguejos mantidos com a dieta HP. Também em outro crustáceo, o camarão *Litopenaeus vannamei*, a capacidade gliconeogênica hepatopancreática é modulada pela concentração de carboidratos da dieta, com alta atividade da PEPCCK em camarões alimentados com baixa concentração de carboidratos (Rosas et al., 2001). Contudo, em *C. granulatus* no estado alimentado, a capacidade gliconeogênica do hepatopâncreas não é influenciada pela composição da dieta (Oliveira e Da Silva, 1997). Recentemente, Marqueze et al. (2006) verificaram que a oxidação de ^{14}C -lactato, no músculo mandibular de *C. granulatus* alimentado com a dieta HC, foi significativamente

menor quando comparada àquela observada nos animais alimentados com a dieta HP. Estes resultados sugerem que no músculo do grupo HC a via gliconeogênica estaria envolvida na metabolização do lactato no estado alimentar.

Nos caranguejos alimentados com a dieta HC os valores de conversão do ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose no músculo mandibular, aos 15 dias de jejum, foram menores que aqueles do grupo alimentado. Essa diminuição da capacidade gliconeogênica coincide com o decréscimo de 62% e 66% nos valores de glicose e lactato, respectivamente, na hemolinfa. Também uma redução, não significativa, de 46% na concentração de glicogênio no músculo mandibular é constatada aos 15 dias de jejum. Tais resultados sugerem que, nos caranguejos alimentados com a dieta HC, os carboidratos provenientes da dieta manteriam os valores de lactato na hemolinfa a níveis superiores àqueles dos animais alimentados com a dieta HP. Assim, nos caranguejos previamente alimentados com a dieta HC, a redução no aporte alimentar de carboidratos durante o jejum diminuiria os valores de lactato na hemolinfa e contribuiria para a diminuição da atividade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato verificada neste estudo. Também neste grupo alimentar não foi verificada, após 15 dias de jejum, alteração significativa na conversão de ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicogênio. Em *C. granulatus* previamente alimentados com a dieta HC, as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e nas brânquias apresentam valores bastante reduzidos aos 15 dias de jejum quando comparados aos animais alimentados (Vinagre e Da Silva, 1992), contribuindo assim para a diminuição na concentração de lactato hemolinfático constatada nesse grupo após 15 dias de jejum. Entretanto, em *L. vannamei* previamente alimentado com uma dieta rica em carboidratos e pobre em proteínas, o lactato hemolinfático não apresenta variações significativas ao longo de 21 dias de jejum (Pascual et al., 2006).

Neste trabalho, a manutenção do glicogênio no músculo mandibular, durante 15 dias de jejum, pode ser explicada pelo aumento da atividade gliconeogênica no hepatopâncreas constatada por Oliveira et al., (2004) em *C. granulatus* alimentado previamente com dieta HC e mantido em restrição alimentar pelo mesmo período de tempo em condições experimentais semelhantes à deste estudo. Recentemente, Pascual et al., (2006) verificaram que o jejum de 21 dias aumentou a concentração de glicogênio no hepatopâncreas de *L. vannamei* previamente alimentado com uma dieta rica em carboidratos e pobre em proteínas.

A capacidade dos caranguejos alimentados com a dieta HP manterem, após 15 dias em jejum, com pouca variação, a concentração do glicogênio no músculo mandibular e a de glicose na hemolinfa, sem alterar a capacidade gliconeogênica no músculo mandibular, parece resultar do aumento significativo da capacidade gliconeogênica hepatopancreática a partir de aminoácidos, constatada por Oliveira et al., (2004) em *C. granulatus* alimentado com uma dieta HP. Além disso, nesses caranguejos, o aumento significativo da concentração hemolinfática de lactato aos 15 dias de jejum, provavelmente proveniente da glicogenólise no músculo da quela (Vinagre e Da Silva, 1992), é acompanhado de aumento na síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -lactato no músculo mandibular.

O ajuste metabólico que ocorre na realimentação é diferente daqueles constatados no jejum e no estado alimentado. O ajuste da realimentação é caracterizado por estímulo dos processos de síntese e, em algumas espécies de animais, um longo período é necessário para que o padrão metabólico do estado alimentado seja atingido (Hervant et al., 1999).

Nos caranguejos realimentados com a dieta HC, constata-se, as 72 e 96 horas, um aumento significativo das concentrações de glicose hemolinfática em relação ao jejum e ao estado alimentado. Tais resultados sugerem que, nos animais realimentados, os carboidratos provenientes da dieta seriam responsáveis pelo aumento dos níveis de glicose na hemolinfa, pois não ocorreu um aumento da síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato no músculo mandibular, os valores são semelhantes àqueles verificados no estado alimentar. Ainda, a concentração de lactato na hemolinfa aumentou significativamente após a realimentação (72 e 96 horas) quando comparada aos valores de jejum, assemelhando-se aos níveis dos caranguejos alimentados. Entretanto, a capacidade neoglicogeniogênica é estimulada e, com aumento de 70% na concentração de glicogênio muscular, os valores deste polissacarídeo assemelham-se aqueles do grupo alimentado (controle).

Às 120 horas de realimentação com a dieta HC o padrão metabólico do estado alimentado é atingido com valores de glicose e lactato hemolinfáticos semelhantes àqueles constatados no grupo controle alimentado. Também as capacidades de síntese de ^{14}C -glicose e de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -lactato assemelham-se àquelas verificadas no grupo alimentado.

Em *C. granulatus* realimentados com a dieta HP por 72 horas não se constata variação significativa na concentração de glicose circulante, entretanto, o valor de lactato na hemolinfa diminuiu, atingindo valores semelhantes àqueles verificados no grupo alimentado. Esta diminuição dos níveis de lactato circulante é acompanhada de aumento na capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -lactato e manutenção em valores elevados de síntese de ^{14}C -glicogênio no músculo mandibular, explicando o aumento significativo na concentração de glicogênio neste tecido às 72 horas de realimentação com uma dieta HP.

Em *C. granulatus*, a realimentação de 48 horas com uma dieta de carne bovina aumentou a conversão de ^{14}C -glicina em ^{14}C -glicose, mas não a formação de ^{14}C -glicogênio no músculo da quela (Vinagre e Da Silva, 2002). Em outros crustáceos, como *Niphargus rhenorhodanensis* e *N. virei*, a realimentação com dieta rica em proteínas aumenta a concentração de glicogênio dos animais (Hervant et al., 1999).

A realimentação com uma dieta HP durante 96 horas diminui significativamente os níveis de glicose circulante, mas mantém a concentração de lactato com valores semelhantes àqueles do grupo controle e realimentado por 72 horas. Os valores de síntese de ^{14}C -glicose e de ^{14}C -glicogênio no músculo mandibular não sofrem alterações significativas entre 72 e 96 horas de realimentação, contudo, a concentração de glicogênio diminuiu cerca de 48%. Essa glicogenólise muscular seria uma das vias responsáveis pelos aumentos nas concentrações de glicose e de lactato circulantes verificados às 120 horas de realimentação com a dieta HP. Neste momento (120 horas) ocorre uma redução na atividade das vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica a partir de ^{14}C -lactato, que contribuiria também para o aumento dos níveis de lactato circulante constatado neste grupo experimental.

Os resultados do presente trabalho demonstram que o *C. granulatus* é um caranguejo adaptado ao jejum mantendo a homeostase metabólica. Contudo, o padrão metabólico de adaptação ao jejum utiliza diferentes vias segundo a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo. Durante o jejum a capacidade gliconeogênica reduz em caranguejos mantidos com a dieta HC. Contudo, em animais mantidos com a dieta HP um aumento na atividade da via neoglicogeniogênica é constatado após 15 dias de jejum.

Em caranguejos alimentados com a dieta HP as vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica estariam envolvidas na redução dos valores de lactato no período de realimentação. Entretanto, nos animais mantidos com a dieta HC estas vias seriam responsáveis pela manutenção dos níveis de lactato no estado alimentado.

Auxílios financeiros

O presente trabalho teve o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOND-BUCKUP, G.; FONTOURA, N.F.; MARRONI, N.P.; KUCHARSKI, L.C.R. **O Caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1991.
- BOTTO, J.L.; IRIGOYEN, H.P.. Biecológia de la comunidad del cangrejal contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. **Sem. Latinoam. Ecol. Bionica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur.** UNESCO, Montevideo, Uruguay, p. 161-169, 1980.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72 p. 248-254, 1976
- CHITTO, A.L.F.; 2005. 118f. **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- D'INCAO, F.; RUFFINO, M.L.; SILVA, K.G.; BRAGA, A.C. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) na barra de Rio Grande, RS **Atlântida**, v. 12 (2), p. 85-93, 1990.
- DRACH, F.; TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu.**, v.161, p. 595-607, 1967.
- GEARY, N.; LANGHANS, W.; SCHARRER, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression os feeding in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 241, n. 10, p. R330-335, 1981.
- HERVANT, F.; MATHIEU, J.; BARRE, H. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding. **J. Exp. Biology.**, v. 202, p. 3587-3595, 1999.
- MARQUEZE, A.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 332, p.198-205, 2006.
- MOON, T.W. Adaptation, constraint, and the function of the glyconeogenic pathway. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 1059-1068, 1988.
- NEWSHOLME, E.A.; LEECH, A.R. **Biochemistry for the medical sciences**. New York: John Wiley & Sons, 1983.

- OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A, n. 4, p. 1429-1435, 1997.
- OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C.; DA SILVA, R.S.M.. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. **Mar. Biol.**, v. 139, p. 335-342. 2001
- OLIVEIRA, G.T.; ROSSI, I.C.; KUCHARSKI L.C.; DA SILVA R.S.M. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.137A, p. 383-390, 2004.
- PASCUAL, C.; SÁNCHEZ, A.; ZENTENO, E.; CUZON, G.; GABRIELA, G.; BRITO, R.; GELABERT, R.; HIDALGO, E.; ROSAS, C. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 251, p. 416-429, 2006.
- ROSAS, C; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; LePRIOL, Y.; PASCUAL, C.; ROSSIGNYOL, J.; CONTRERAS, F.; SANCHEZ, A.; VAN WORMHOUDT, A. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 259, p. 1-22, 2001.
- SCHEIN, V.; CHITTÓ, A.L.F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C.; WORMHOUDT, A.V.; DA SILVA, R.S.M. Effects of hypo- or Hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 316, p. 203-212, 2005.
- SCHEIN, V.; WACHÉ, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.C., WORMHOUDT, A.V.; DA SILVA, R.M.S. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters**, v. 561, p. 202-206, 2004.
- SOMMOGY, M. Determination of blood sugar. **Journal Biol. Chem.**, v. 160, p. 69-73, 1945.
- SUGDEN, M.C.; HOLNESS, M.J.; PALMER, N.T. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. **Biochem. J.**, v. 263, p. 313-323, 1989.
- THOMAS, G.A.; SCHLENDER, K.K.; LARNER, J. A rapid filter paper assay for UDP-glucose glucosyl-transferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 489-499, 1968.
- TURCATO, G.S. 1990. **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt. Biochem.**, v. 11, p. 256-265, 1965.

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

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

XAVIER, A.R.; ROSELINO, J.E.S.; RESANO, N.M.Z.; GAROFALO, M.A.R.; MIGLIORINI, R.H.; KETTELHUT, I.C. Glyconeogenic pathway in isolated skeletal muscles of rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, p. 164-169, 2002.

ANEXO 1

Instruções para publicação no periódico “Journal of Comparative Physiology B”.

Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. Editor-in-Chief: G. Heldmaier - Editors: H.V. Carey; I.D. Hume. ISSN: 0174-1578 (print version); ISSN: 1432-136X (electronic version). Springer Berlin Heidelberg

Instructions for Authors

The "Journal of Comparative Physiology B" (Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology) publishes original articles in general and comparative animal physiology. Preliminary communications will not be considered.

Manuscript submission

Authors should submit their articles to "Journal of Comparative Physiology B" online to facilitate even quicker and more efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing time and shortens overall publication time. Please log directly onto the link below and upload your manuscript following the instructions given on screen.

Submit online: Legal requirements

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before (except in the form of an abstract, or as part of a published lecture, or thesis); that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

The "Copyright Transfer Statement" has to be signed and faxed to the publisher together with the corrected proofs (see below) with which it will be provided by the publisher shortly after the manuscript has been accepted for publication.

Manuscript preparation

All manuscripts are subject to peer review and copy editing. There are no page charges. Manuscripts must be written in English and should be typed double-spaced throughout (including acknowledgements, references, tables, and figure legends) with at least 2.5 cm (1 inch) margins. Use a normal, plain font (e.g., Times New Roman) for text. Use the automatic page numbering function to number the pages. For indents use tab stops or other commands, not the space bar. Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.

Units, symbols, abbreviations

SI units and the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) are recommended; except for thermodynamics, the Celsius temperature scale should be used. Abbreviations must be kept to a minimum; ad hoc abbreviations should be avoided. Except for standard physiological and biochemical abbreviations (R.Q., e.p.s.p., STDP, ATP, NAD, EDTA, etc.), all abbreviations must be explained in a footnote on the title page.

Citations and references

Literature citations in the text should indicate the author's surname with the year of publication in parentheses, e.g. Carlin (1992); Brooks and Carlin (1992). If there are more than two authors, only the first should be named, followed by "et al."

References at the end of the paper should be listed in alphabetical order by the first author's name. If there is more than one work by the same author or team of authors in the same year, a, b, etc. is added to the year both in the text and in the list of references.

*Journal papers: name(s) and initial(s) of all authors; year; full title; journal title abbreviated in accordance with international practice; volume number; first and last page numbers. Example: Stokes DR, Josephson RK (2004) Power and control muscles of cicada song: structural and contractile heterogeneity. *J Comp Physiol A* 190:279-290.

If available, the Digital Object Identifier (DOI) of the cited literature should be added at the end of the reference in question. Example: Speake BK, Herbert JF, Thompson MB (2004) Comparison of the fatty-acid compositions of prey items and yolks of Australian insectivorous scincid lizards. *J Comp Physiol B* DOI 10-1007/s00360-004-0425-5

*Single contributions in a book: name(s) and initial(s) of all authors; year; title of article; editor(s); title of book; edition; volume number; publisher; place of publication; page numbers. Example: Keil TA (1999) Morphology and development of the peripheral olfactory organs. In: Hansson BS (ed) *Insect olfaction*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 5-47

***Book:** name and initial(s) of all authors; year; title; publisher; place of publication. Example: Steward O (2000) *Functional Neuroscience*. Springer, Berlin Heidelberg New York

Please arrange your manuscript as follows:

Title page (page 1)

Including name(s) of author(s), a concise and informative title, affiliation(s) of the author(s), e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author, and footnotes to the title page (including an alphabetical list of abbreviations).

Abstract

Only the main results should be summarized without giving references or abbreviations. The abstract must comprise a maximum of 200 words. Five keywords

Introduction

Lengthy introductions should be avoided, and the subject should be approached in a straightforward manner.

Materials and methods

Except for well-known methods, experimental methods should be explained in sufficient detail.

Results Discussion

For short papers, the Results and Discussion sections may be combined

Acknowledgements

Please include at the end of the acknowledgements a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which the experiments were performed.

References

Figure legends

Tables

Figures

Tables and figures

Tables must be numbered consecutively with arabic numerals and submitted separately from the text. They should have a heading explaining any abbreviation used in that table. Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters. Each table must be typed on a separate sheet together with its heading, and ample space should be allowed for editorial comments. Illustrations must be restricted to the minimum needed to clarify the text. All figures (photographs, graphs or diagrams) should be cited in the text, and numbered consecutively throughout. Figure parts should be identified by lower-case roman letters (a, b, etc.). If illustrations are supplied with uppercase labeling, lower-case letters will still be used in the figure legends and citations. Figure legends must be brief, self-sufficient explanations of the illustrations. The legends should be placed at the end of the text. Submit all figures on separate sheets, each bearing the figure number and the author's names, and do not integrate them within the text.

Line drawings

Inscriptions should be legible, with initial capital letters and appropriately scaled to the size of the drawing. Letters 2 mm high are recommended. Scanned line drawings should be digitized with a resolution of 800 dpi relative to the final figure size.

Computer drawings

Computer drawings are acceptable provided they are of comparable quality to line drawings (minimum resolution of 300 dpi). Computer-drawn curves and lines must be smooth. Lettering must be of high quality; Helvetica is the preferred font. Lettering fonts must be consistent within and among all figures.

Halftone illustrations (black and white and color)

Magnification should be indicated by scale bars. For scanned halftone illustrations, a resolution of 300 dpi is usually sufficient, TIFF is the preferred file format.

Color illustrations

Color figures will always be published in color in the online version. In print, however, they will only appear in color if the author agrees to make a contribution of Euro 950/US \$ 1,150 (plus VAT) per article. Otherwise the figures will be printed in black and white. Save color illustrations as RGB (8 bits per channel) in TIFF format.

Plates

Several figures or figure parts should be grouped in a plate on one page.

Vector graphics

Fonts used in the vector graphics must be included. Please do not draw with hairlines. The minimum line width is 0.2 mm (i.e., 0.567 pt) relative to the final size. EPS is the preferred file format. EPS files must always contain a preview in TIFF of the figure.

Size of figures

The figures, including legends, should either match the column width (86 mm) or the print area of 176 x 236 mm. In case reduction is absolutely necessary, please state the alternative scale desired. The publisher reserves the right to reduce or enlarge illustrations.

Electronic Supplementary Material

Electronic Supplementary Material (ESM) for a paper will be published in the electronic edition of this journal provided the material is: submitted in electronic form together with the manuscript accepted after peer review.

ESM may consist of: - information that cannot be printed: animations, video clips, sound recordings (use QuickTime, .avi, .mpeg, animated GIFs, or any other common file format) information that is more convenient in electronic form: sequences, spectral data, etc. - large

quantities of original data that relate to the paper, e.g. additional tables, large numbers of illustrations (color and black & white), etc.

Legends must be brief, self-sufficient explanations of the ESM. ESM is to be numbered and referred to as S1, S2, etc. After acceptance for publication, ESM will be published as received from the author in the online version only. Reference will be given in the printed version.

Proofreading

Authors are informed by e-mail that a temporary URL has been created from which they can obtain their proofs. Proofreading is the responsibility of the author. Authors should make their proof corrections (formal corrections only) on a printout of the pdf file supplied, checking that the text is complete and that all figures and tables are included. Substantial changes in content, e.g. new results, corrected values, title and authorship are not allowed without the approval of the responsible editor. In such a case please contact the Editorial Office before returning the proofs to the publisher. After online publication, corrections can only be made in exceptional cases and in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the paper.

Online First

Papers will be published online about one week after receipt of the corrected proofs. Papers published online can already be cited by their DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Offprints

Thirty offprints of each contribution are supplied free of charge. If you wish to order additional offprints you must return the order form which is provided with the proofs and return it together with the corrected proofs.

Springer Open Choice

In addition to the traditional publication process, Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice (Springer's open access model). A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular article, but in addition is made freely available through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice upon acceptance of your manuscript, please click on the link below to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before free access publication.