

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

**REORGANIZAÇÃO DO CONSUMO ENERGÉTICO
EM TECIDOS DO CARANGUEJO *Neohelice granulata* SUBMETIDO
À HIPÓXIA E REOXIGENAÇÃO:
ESTRATÉGIAS METABÓLICAS E MOLECULARES**

Tese de Doutorado

TIAGO LEAL MARTINS

Porto Alegre, 2014



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



REORGANIZAÇÃO DO CONSUMO ENERGÉTICO
EM TECIDOS DO CARANGUEJO *Neohelice granulata* SUBMETIDO
À HIPÓXIA E REOXIGENAÇÃO:
ESTRATÉGIAS METABÓLICAS E MOLECULARES

TIAGO LEAL MARTINS

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Tese 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 Doutor.

Porto Alegre, 2014

Comissão Examinadora

Wânia Aparecida Partata
Profª Doutora do Programa de Pós-graduação em
Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS

Guendalina Turcato de Oliveira
Profª Doutora do Programa de Pós-graduação em
Zoologia – PUCRS

Marta Marques de Souza
Profª Doutora do Programa de Pós-graduação em
Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais e
Fisiologia Animal Comparada – FURG

Dedico este trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Roselis Silveira Martins da Silva, pela dedicação ao longo desse trabalho, depositando muita confiança, paciência e transferindo conhecimentos.

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

Aos Professores Luciano, Márcia e Anapaula pelo agradável convívio e pelas oportunidades e ensinamentos que contribuíram muito para a minha formação profissional.

À Professora Vanessa Schein pela acolhida no seu laboratório, pela orientação na execução da etapa de biologia molecular, e acima de tudo pela amizade e comprometimento.

Ao grande amigo Ricardo Pellegrino pelo companheirismo e pelos conselhos no início da minha jornada no doutorado, e por estar sempre disposto, apesar da distância, a me auxiliar nas dúvidas que surgiam sobre protocolos e cálculos experimentais.

Aos antigos e novos colegas do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC) por proporcionarem um ambiente agradável para trabalhar e pelos momentos de prazer e descontração.

Aos colegas do Departamento de Fisiologia pela convivência e amizade.

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

Aos meus pais e irmãos, que desde sempre acreditaram em mim e me apoiaram nos momentos difíceis.

À minha esposa Tatiana, sem dúvida a minha maior descoberta nesses quatro anos de doutorado, pelo amor, carinho e compreensão.

E, por fim, ao meu filho José Roberto, que ainda está a caminho, mas tenho certeza que trará muitas alegrias nas próximas etapas da minha vida.

RESUMO

A hipóxia ambiental afeta os animais em uma ampla extensão de *habitats*, desde sistemas aquáticos até ambientes terrestres e de altitude. A transição para ambiente com baixo teor de oxigênio requer a supressão coordenada das atividades celulares que são consumidoras e produtoras de ATP, bem como uma reorganização das prioridades para o uso de energia. O presente estudo teve como objetivo ampliar o entendimento das estratégias metabólicas utilizadas para a reorganização do consumo energético nas brânquias anteriores e posteriores, músculo mandibular e hepatopâncreas de caranguejos *Neohelice granulata* submetidos ao estresse hipóxico e à reoxigenação, além de determinar a expressão gênica do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α) e a sua relação no controle dessas respostas. Para isso foram utilizados caranguejos machos coletados na Lagoa de Tramandaí (RS), submetidos à hipóxia (38 Torr de O₂ dissolvido na água) por 1h ou 8h e a períodos de recuperação após hipóxia, em normóxia (155 Torr de O₂), por 3h ou 24h após cada período de estresse hipóxico.

Durante a hipóxia por 1h e subsequentes períodos de recuperação, a redução na atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase indica que o caranguejo *N. granulata* apresenta uma estratégia de redução da demanda de ATP. No entanto, a manutenção da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase em períodos mais prolongados de hipóxia (8h) demonstra que o animal utiliza estratégias alternativas para compensar o gasto energético com a atividade dessa enzima.

Em ambos os tempos de hipóxia (1h e 8h), a capacidade de síntese proteica a partir de ¹⁴C-leucina se manteve inalterada na maioria dos tecidos estudados, indicando que a estratégia de supressão da síntese de proteínas, para diminuir o consumo de ATP frente ao estresse hipóxico, não foi utilizada pelo caranguejo. Ainda, a manutenção de níveis basais de formação de CO₂ a partir de ¹⁴C-piruvato, associada ao aumento dos níveis de glicose e lactato na hemolinfa, indicam que a mobilização de glicose nos tecidos excede sua utilização pela via glicolítica, causando seu acúmulo na hemolinfa, e o metabolismo anaeróbico é intensamente utilizado pelo caranguejo durante esse período. Durante a fase de recuperação pós-hipóxia, embora os níveis de glicose e de lactato na hemolinfa diminuam gradativamente, a redução na oxidação de piruvato a CO₂ nos tecidos estudados dos animais submetidos à 8h de hipóxia indica que a oxidação destes substratos não é a via utilizada para metabolizar a glicose e/ou lactato produzidos durante o estresse. Por outro lado, o aumento da produção de CO₂ nas brânquias anteriores após 24h de recuperação pós-hipóxia de 1h sugere uma participação desse tecido na metabolização desses substratos.

Pela primeira vez em *N. granulata* foi demonstrada a participação do HIF-1 α na resposta ao estresse hipóxico e seu possível envolvimento com a mobilização de substratos energéticos. A diminuição na expressão de HIF-1 α no músculo, durante a hipóxia de 1h e a recuperação pós-hipóxia, pode ser interpretada como

uma resposta ao aumento da concentração da proteína HIF-1 α celular. No hepatopâncreas, após 24h de reoxigenação, o aumento nos níveis de mRNA de HIF-1 α sugere a participação deste gene no controle do metabolismo da glicose no hepatopâncreas de *N. granulata*.

O presente estudo demonstra que as estratégias utilizadas pelo caranguejo *N. granulata* para reorganizar as prioridades do uso de energia são dependentes do tempo de exposição ao estresse hipóxico e essas respostas são tecido-específicas.

PALAVRAS-CHAVE: Hipóxia, recuperação pós-hipóxia, metabolismo energético, HIF-1 α , caranguejo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ARNT – *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*

ATP – Adenosina trifosfato

bHLH – *basic helix-loop-helix*

CBP/p300 – Co-activators Biding Protein/p300

cT – *Cycle Threshold*

CTAD – Domínios C Terminal de Transativação

EDTA – Ácido Etilendinitrilotetracético Sal Dissódico

FIH-1 – Fator de inibição do HIF

HEPES – (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-n'-[2~ethanesulfonic acid])

HIF-1 – Fator Induzível por Hipóxia 1

HPH – HIF Prolil Hidroxilase

NTAD – Domínios N Terminal de Transativação

ODD – Domínio de Degradação Dependente de Oxigênio

PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

PK – Piruvato quinase

PHD – Domínio Prolil Hidroxilase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

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

PPO – 2,5-Diphenyloxazole

pVHL – Proteína von Hippel-Lindau

SFC – Solução fisiológica de caranguejo

SNK – *Student-Newman-Keuls*

TCA – Ácido tricloracético

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Representação esquemática do mecanismo de regulação do fator induzível por hipóxia (HIF)..... | 4 |
| Tabela 1 – Representação esquemática do desenho experimental..... | 16 |
| Tabela 2 – Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre as concentrações de glicose e lactato na hemolinfa do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> | 29 |
| Figura 2 – Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a síntese de ¹⁴ C-proteínas totais a partir de ¹⁴ C-leucina em tecidos do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> | 31 |
| Figura 3 – Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a produção ¹⁴ CO ₂ a partir de [1- ¹⁴ C]-ácido pirúvico em tecidos do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> ... | 33 |
| Figura 4 – Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase em tecidos do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> | 35 |
| Figura 5 – Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a concentração de ATP em tecidos do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> | 37 |
| Figura 6 – Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a expressão gênica do fator induzível por hipóxia 1α (HIF-1α) em tecidos do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> | 39 |
| Figura 7 – Comparação entre as expressões gênicas do HIF-1α nos tecidos do caranguejo <i>N. granulata</i> em normóxia..... | 40 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | |
| 3.1 Animais..... | 15 |
| 3.2 Procedimentos Experimentais..... | 15 |
| 3.3 Determinações Bioquímicas..... | 17 |
| 3.3.1 Determinação da conversão de ¹⁴ C-leucina em ¹⁴ C- proteínas..... | 17 |
| 3.3.2 Determinação da formação de ¹⁴ CO ₂ a partir de ¹⁴ C-ácido pirúvico | 18 |
| 3.3.3 Determinação da atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (E.C. 3.6.1.3)..... | 19 |
| 3.3.4 Determinação de ATP tecidual..... | 20 |
| 3.3.5 Deteminação de proteínas..... | 20 |
| 3.3.6 Determinação das concentrações de glicose e de lactato na hemolin- fa..... | 21 |
| 3.3.7 Determinação da expressão do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF- 1 α)..... | 21 |
| 3.3.7.1 Desenho das sequências sintéticas (<i>primers</i>)..... | 21 |
| 3.3.7.2 Extração de RNA..... | 22 |
| 3.3.7.3 Síntese de cDNA..... | 23 |
| 3.3.7.4 Sequenciamento genético..... | 23 |
| 3.3.7.5 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real (qPCR)..... | 25 |
| 3.3.7.6 Cálculo da expressão relativa..... | 25 |
| 3.4 Análise Estatística..... | 26 |
| 4. RESULTADOS | 28 |
| 5. DISCUSSÃO | 41 |
| 6. CONCLUSÃO | 53 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |
| ARTIGO CIENTÍFICO | 68 |

1. INTRODUÇÃO

A hipóxia ambiental afeta os animais em uma ampla extensão de *habitats*, desde sistemas aquáticos até ambientes terrestres e de altitude (Burnett e cols., 2007). A transição para ambiente com baixo teor de oxigênio requer a supressão coordenada das atividades celulares que são consumidoras e produtoras de ATP, bem como uma reorganização das prioridades para o uso de energia (Ramnanan e Storey, 2006; Storey e Storey, 2004).

Em animais que enfrentam diferentes formas de estresse em seus *habitats*, reduzir o bombeamento iônico diminui significativamente o gasto energético (Staples e Buck, 2009). A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, uma das maiores consumidoras de ATP celular, reduz em cerca de 75% em hepatócitos de tartarugas submetidas à anoxia (Buck e Hochachka, 1993). Como a homeostase iônica é uma função prioritária na célula, 28% do consumo de ATP nos hepatócitos é direcionado à Na^+/K^+ -ATPase em condições de normóxia. No entanto, em anoxia, 74% do ATP produzido na célula são direcionados para a Na^+/K^+ -ATPase, apesar da redução de 75% da sua atividade (Buck e Hochachka, 1993). Inicialmente foi proposto que a regulação da atividade catalítica da Na^+/K^+ -ATPase ocorra por meio de alterações na afinidade ao substrato. No entanto, estudos recentes têm demonstrado que a enzima é regulada por fosforilação, resultando tanto na endocitose como na exocitose desta molécula a partir da membrana plasmática para os compartimentos internos (Wheaton e Chandel, 2011).

Outro meio de reduzir a demanda energética é a supressão da síntese proteica (Storey e Storey, 2007). Este processo responde por cerca de 18-26% do gasto energético celular e sua diminuição é um dos maiores contribuintes para res-

tringir o consumo de ATP (Lewis e cols., 2007). No entanto, como observado em peixes *A. ocellatus* submetidos à hipóxia aguda, existe uma diferença tecido-específica na magnitude da depressão na síntese proteica induzida pela hipóxia, sendo que no cérebro houve uma redução em cerca de 20% e nos demais tecidos em torno de 50-60%, sugerindo que as funções cerebrais são mantidas durante a hipóxia para facilitar o comportamento de fuga em resposta à predação (Lewis e cols., 2007).

A diminuição no teor de oxigênio exerce efeitos celulares diretos, promovendo mudanças significativas na expressão de fatores responsivos a esse tipo de estresse (Burnett e cols., 2007). Trabalhos recentes em vertebrados demonstraram o papel do fator induzível por hipóxia 1 (HIF-1) no controle da expressão gênica de proteínas envolvidas na resposta à hipóxia. O HIF-1 é uma proteína heterodimérica, pertencente ao subgrupo da família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH – *basic helix-loop-helix*), composta por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β , esta última também conhecida como ARNT (*Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) (Wang e cols., 1995). Cada subunidade possui dois domínios PAS, denominados PAS-A e PAS-B. O domínio PAS foi designado como uma região comum encontrada no gene *per* de *Drosophila*, envolvido na manutenção do ritmo circadiano; ARNT humano e no gene *sim* de *Drosophila*, envolvido na diferenciação celular (Ferreira, 2006).

A atividade do HIF-1 é regulada por um mecanismo de modificação pós-traducional do HIF-1 α , aumentando a estabilidade proteica e a capacidade de transativação. A subunidade HIF-1 α possui dois domínios terminais de transativação: o domínio N terminal (NTAD) e o C terminal (CTAD). O domínio N terminal é também chamado de domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD), o qual confe-

re a regulação do nível proteico de HIF-1 α em função da concentração do oxigênio molecular. A principal função do CTAD é recrutar e interagir com proteínas co-ativadoras transcricionais como o CBP/p300 (*Co-activators Biding Protein/p300*) (Semenza, 2003; Poellinger e Johnson, 2004).

Na presença de oxigênio, HIF-1 α sofre várias modificações como a hidroxilação de dois resíduos de prolina, no domínio ODD e a acetilação de um resíduo de lisina. Essas modificações são mediadas por proteínas possuidoras de domínios prolil hidroxilase (PHDs) ou HIF prolil hidroxilase (HPHs). A hidroxilação destes resíduos promove uma interação de alta afinidade entre HIF-1 α e a proteína do gene supressor de tumor von Hippel-Lindau (pVHL). A pVHL funciona como um substrato de reconhecimento a um complexo ubiquitina ligase E3 que medeia a ubiquitinação do HIF-1 α , levando à sua rápida degradação via proteassoma (Hägg e cols., 2005) (Figura 1).

Outro tipo de regulação do HIF-1 α ocorre por meio da hidroxilação de um resíduo de asparagina localizada na região CTAD. Esta modificação que é mediada pelo fator de inibição do HIF (FIH-1), bloqueia a interação do CTAD com o co-ativador transcricional CBP/p300, inibindo assim a transativação mediada pelo HIF-1 α . Além disso, foi recentemente demonstrado que FIH-1 pode diminuir a atividade da subunidade HIF-1 α mesmo em situações de hipóxia severa, sendo, portanto, um mecanismo potencial de regulação do HIF-1 em condições que as PHDs não são capazes de atuar (Stolze e cols., 2004; Bardos e Ashcroft, 2005). FIH-1 também interage com o pVHL facilitando o recrutamento de HIF-1 α para subsequente ubiquitinação e degradação desta subunidade (Mahon e cols., 2001).

Em condições hipóxicas, a modificação e a degradação do HIF-1 α cessam, havendo um rápido acúmulo desta subunidade no citoplasma e sua translocação

para o núcleo, onde ocorre sua dimerização com o HIF-1 β . O complexo HIF-1 formado torna-se ativo, iniciando a transcrição de genes-alvo ao ligar-se a uma sequência de pentanucleotídeos no DNA, denominada elementos responsivos à hipóxia (HREs) (Poellinger e Johnson, 2004; Hägg e Stefan, 2005) (Figura 1).

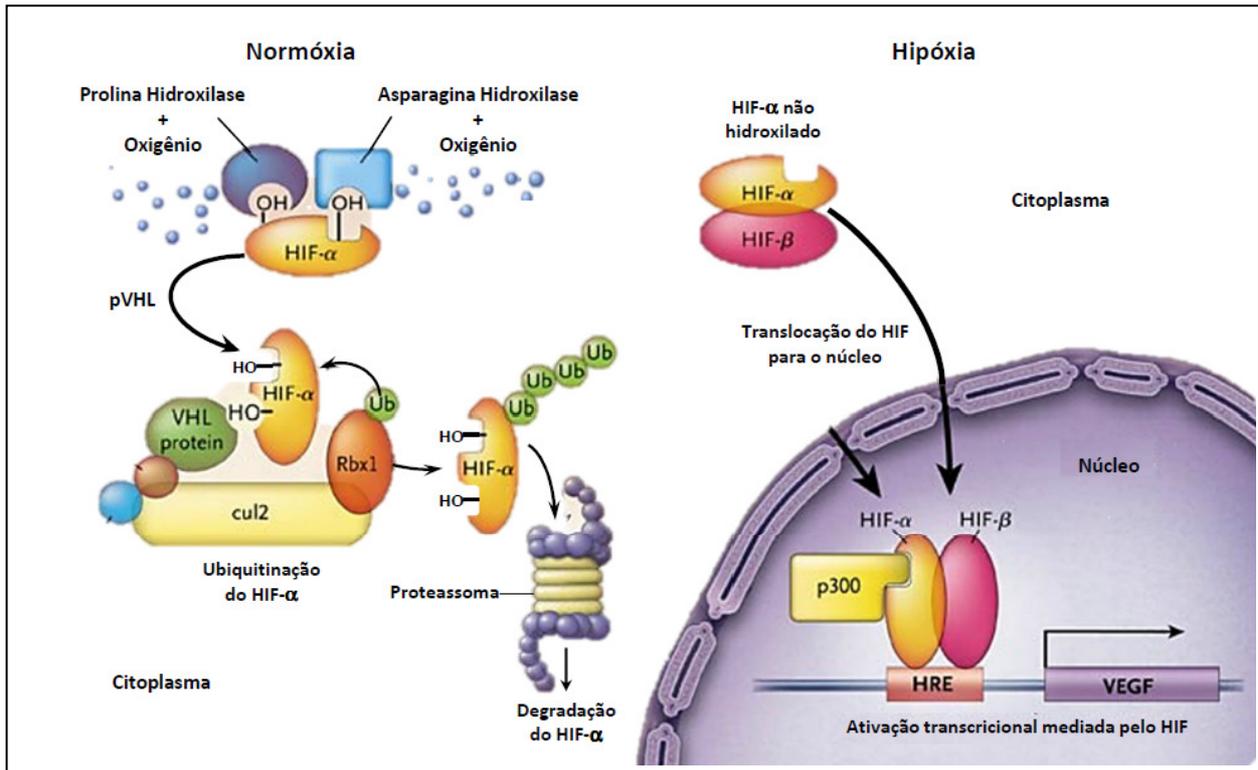


Figura 1: Representação esquemática do mecanismo de regulação do fator induzível por hipóxia (HIF). Adaptado de Cohen e McGovern (2005).

Ao contrário da subunidade α , a subunidade HIF-1 β é expressa constitutivamente no núcleo e sua atividade é controlada independentemente dos níveis de oxigênio (Stockmann e Fandrey, 2006).

Em mamíferos, os genes-alvo do HIF-1 estão envolvidos principalmente na angiogênese, eritropoiese, transporte de glicose e glicólise anaeróbica, processos que são essenciais para melhorar a oxigenação dos tecidos e produção de energia (Semenza, 2001).

Embora a dinâmica e as respostas funcionais do HIF tenham sido mais bem estudadas em mamíferos, genes homólogos ao HIF desta classe já foram encontrados em peixes, anfíbios, aves e invertebrados (Hardy e cols., 2012). Entretanto, as informações sobre o papel do HIF na resposta metabólica à hipóxia nestes animais são comparativamente limitadas. A ativação da expressão deste fator, em resposta à baixa tensão de oxigênio, pode ser uma das principais estratégias utilizadas pelos crustáceos para permitir a transição celular do estado aeróbio para o anaeróbio, e permitir que esses animais adaptem-se aos ambientes com grandes variações de oxigênio na água.

No camarão *Litopenaeus vannamei*, a sequência de cDNA das subunidades α e β do HIF-1 foram caracterizadas e mostraram que são expressas diferentemente em brânquias, hepatopâncreas e músculo durante a normóxia e a hipóxia (Soñanez-Organis e cols., 2009). Além disso, o silenciamento de ambas as subunidades altera as concentrações de glicose e lactato na hemolinfa e a expressão e atividade da enzima hexoquinase em camarões expostos à hipóxia, sugerindo que as respostas metabólicas deste animal ao estresse hipóxico são mediadas pelo HIF-1 (Soñanez-Organis e cols., 2010).

Recentemente, Hardy e cols. (2012) sugeriram que em tecidos do siri *Callinectes sapidus* as subunidades HIF-1 α e β são expressas constitutivamente em normóxia. Entretanto, após a exposição dos animais à hipóxia, a expressão de HIF-1 α foi tecido-específica e dependente do tipo de fibra muscular, observando um ligeiro aumento nos níveis de mRNA de HIF-1 α nas fibras oxidativas aeróbicas e uma diminuição significativa nas fibras glicolíticas anaeróbicas.

Várias espécies de crustáceos decápodes, quando confrontadas com a diminuição dos níveis de oxigênio, utilizam mecanismos fisiológicos e bioquímicos a

fim de compensar a falta de oxigênio. Algumas espécies são capazes de obter oxigênio suficiente durante a hipóxia aumentando a ventilação respiratória (McMahon, 2001). Este processo ventilatório ocorre pelo batimento do escafognatito, estrutura responsável por movimentar a água dentro da câmara branquial (Wilkens e McMahon, 1972). Outra estratégia utilizada é o aumento da síntese e/ou afinidade da hemocianina (Taylor e Anstiss, 1999), permitindo um aporte de oxigênio suficiente para os tecidos produzirem energia aeróbica necessária para suprir suas atividades básicas.

No entanto, quando os níveis de oxigênio encontram-se abaixo do nível crítico e a respiração não é capaz de manter a concentração de oxigênio na hemolinfa suficiente para suprir a demanda energética dos diferentes tecidos, uma série de outras respostas pode ser observada. Nestas situações, muitos crustáceos respondem à hipóxia reduzindo o consumo de oxigênio e a atividade locomotora (Santos e cols., 1987; Hervant e cols., 1995), como também utilizando a bradicardia (Gonçalves, 1993; Airriess e McMahon, 1994), alterando ou redirecionando o fluxo sanguíneo para os tecidos que requerem maiores níveis de oxigênio (Reiber e McMahon, 1998).

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinhos e límnicos, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros com exposição do substrato. Esses ecossistemas sofrem influência de fatores oceanográficos e meteorológicos, impondo à sua biota um elevado estresse ambiental. O estresse pode ser gerado pelas variações de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido na água (Cooper, 1974; Odum, 1985).

O caranguejo *Neohelice (Chasmagnathus) granulata* é uma espécie típica de estuário que evoluiu a partir de formas marinhas e situa-se sistematicamente na

Superclasse Crustácea, Ordem Decapoda (Cuesta e cols., 2001). Habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o golfo de San Matías, na Argentina (Boschi, 1964).

Em seu habitat, o *N. granulata* abre galerias ou tocas com profundidades variáveis de acordo com o nível das marés e o lençol freático, de maneira que no fundo da toca sempre haja água. Essas habitações têm papel importante na ecofisiologia do *N. granulata*, pois minimizam as variações de salinidade, de temperatura e de teor de oxigênio (Turcato, 1990). Na lagoa Tramandaí-RS, onde populações de *N. granulata* são encontradas em abundância, os animais sofrem períodos prolongados de hipóxia ou de anoxia, pois o teor de O₂ dissolvido na água pode variar de 2,80 mg O₂/L a 11,78 mg O₂/L, podendo chegar a valores próximos de zero durante o inverno, quando os animais permanecem recolhidos às tocas. Também quando os caranguejos saem em busca de alimento permanecem longos períodos fora d'água, submetidos à hipóxia ou à anoxia ambiental (Turcato, 1990). Devido a essas características ecológicas e comportamentais o *N. granulata* é um excelente modelo biológico para o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas respostas às alterações do teor de oxigênio ambiental.

Esse caranguejo, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos e cols., 1987) é capaz de suportar longos períodos fora d'água e de exposição ao sol sendo considerado tipicamente semi-terrestre (Mañe-Gazon e cols., 1974). Algumas espécies de caranguejos, como o *N. granulata*, possuem a habilidade de manter as brânquias sempre umedecidas, quando estão fora do ambiente aquático, por meio de um sistema de circulação nas bases dos pereiópodes que captam a água da superfície externa do corpo e a liberam na

cavidade branquial, promovendo a renovação do teor de oxigênio (Hartnoll, 1988; Bond-Buckup e cols., 1991; Luquet e cols., 2000).

Os crustáceos utilizam três estratégias adaptativas que permitem a sobrevivência em hipóxia ou anoxia ambiental: 1) manutenção em todos os tecidos de altas concentrações de glicogênio e de fosfato em condições aeróbicas; 2) utilização de vias anaeróbicas para produção de ATP e manutenção do balanço redox; e (3) redução da atividade metabólica (Hervant e cols., 1995; Childress e Seidel, 1998).

Em períodos de normóxia, a glicose, principal monossacarídeo na hemolinfa de crustáceos, é armazenada na forma de glicogênio, principalmente, no músculo, no hepatopâncreas, no coração, nos hemócitos e nas brânquias, sugerindo que a ausência de um depósito central de glicogênio seria uma adaptação importante para caranguejos que em seus *habitats* estariam submetidos a períodos de hipóxia ambiental e que possuem o sistema circulatório do tipo aberto com baixa pressão e fluxo lento, determinando uma distribuição menos efetiva de glicose para os tecidos (Hochachka e Somero, 1984).

Em vertebrados e invertebrados, a ativação da fermentação anaeróbica de carboidrato via glicólise é uma estratégia importante que permite a sobrevivência em hipóxia ou anoxia ambiental por longos períodos (Storey e Storey, 2007). No entanto, existem algumas limitações dessa via no fornecimento de ATP, comparado com as vantagens do metabolismo aeróbio (Da Silva-Castiglioni, 2010). A glicólise aeróbica pode utilizar carboidratos, lipídios e proteínas como substratos para gerar ATP, enquanto em condições anaeróbicas os organismos estão restritos ao uso de carboidratos e poucos aminoácidos. A produção de energia é outro fator limitante, pois a glicólise anaeróbica produz somente 2 moles de ATP por mol de

glicose na conversão a lactato comparada com 36 moles de ATP gerados pela glicólise aeróbica. Portanto, a glicólise anaeróbica, embora seja a principal via para a produção de ATP na ausência de oxigênio, apresenta algumas limitações.

O lactato é o principal produto do metabolismo anaeróbio em crustáceos, sendo acumulado na hemolinfa e em diferentes tecidos após situações de anoxia ou de hipóxia ambiental ou funcional (Van Aardt, 1988; Anderson e cols., 1994; Hervant e cols., 1995, 1999; Zou e cols., 1997; Wachter e cols., 1997). Durante o exercício extenuante os crustáceos produzem altas concentrações de lactato, sendo este metabólito responsável pela acidose induzida pelo exercício físico nestes caranguejos (Wood e Randall, 1981; Henry e cols., 1994; Morris e Adamczewska, 2002). O aumento da concentração de lactato na hemolinfa e nos tecidos está associado à mobilização de glicogênio tecidual (Chang e O' Connor, 1983; Hervant e cols., 1999; Morris e Adamczewska, 2002; Oliveira e cols., 2004).

A relação lactato/glicose (mmol/L / mmol/L) na hemolinfa de *N. granulata* alimentados é elevada, o que sugere que o lactato é um importante substrato energético para este caranguejo (Pellegrino e cols., 2008; Maciel e cols., 2008). Em *N. granulata*, o lactato pode ser oxidado no hepatopâncreas e no músculo (Marqueze e cols., 2006; Maciel e cols., 2008) ou convertido em glicose no hepatopâncreas e no músculo ou em glicogênio no músculo (Oliveira e cols., 1997; 2004; Maciel e cols., 2008).

As concentrações de ATP, AMP e ADP em crustáceos não são muito elevadas, contudo, a concentração de arginina fosfato muscular é significativamente maior neste grupo de invertebrados quando comparada àquela verificada em insetos ou a concentração de creatina fosfato no músculo de vertebrados (Beis e Newsholme, 1975; Hill e cols., 1991). A arginina fosfato é utilizada pelos crustáceos

como substrato energético durante exercício físico intenso e durante a hipóxia ambiental ou tecidual (Hill e cols., 1991; Morris e Adamczewska, 2002).

Da Silva-Castiglioni e cols. (2010) constataram ao comparar duas espécies de lagostins, *Parastacus defossus* e *Parastacus brasiliensis* submetidas a diferentes tempos de estresse hipóxico, que ambos os lagostins estocam e utilizam a arginina fosfato como fonte de reserva durante a hipóxia, principalmente o *P. defossus*, que possui concentrações de reservas energéticas maiores que o *P. brasiliensis*. O *P. brasiliensis* esgotou as reservas de arginina fosfato no músculo em 8 horas de exposição à hipóxia, demonstrando uma menor adaptação desta espécie a esse tipo de estresse.

Rossetti (2010) submetendo caranguejos *N. granulata* à anoxia por 1 hora observou um aumento nas reservas de arginina e de arginina fosfato no músculo e no hepatopâncreas. Apesar de permanecerem em ambiente anóxico por 1h, provavelmente, uma verdadeira anoxia ainda não foi estabelecida nessa primeira hora. Assim, a autora sugere que em um primeiro momento o animal aumenta as reservas de fosfagênios para serem usadas posteriormente, caso a anoxia prossiga por mais tempo. Em outro estudo, Marqueze e cols. (2006, 2011), utilizando o mesmo planejamento experimental, demonstraram que na primeira hora de anoxia as vias glicolíticas anaeróbicas, muscular e hepatopancreática, são responsáveis pela produção de ATP. A ativação da via glicolítica nestes tecidos foi acompanhada pela redução marcante dos valores de glicogênio. Contudo, após esse período de anoxia a atividade da enzima piruvato quinase (PK) decai marcadamente, indicando uma redução do fluxo de carbono pela via glicolítica. Recentemente, Geihs e cols. (2013) após submeter o caranguejo *N. granulata* à hipóxia por 1, 4 e 10 horas, verificou que a atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial no

músculo locomotor diminui apenas após 10 horas de estresse. Este resultado sugere que durante os períodos iniciais da hipóxia, o músculo locomotor não apresenta depressão metabólica.

Este padrão metabólico é também encontrado nas tartarugas, no peixe-dourado, nos moluscos marinhos e no lagostim onde a resposta inicial da transição da normóxia para a hipóxia é a ativação da glicólise, seguida pela depressão do fluxo glicolítico quando a anoxia é estabelecida (Storey e Storey, 1990; Dawson e Storey, 2012).

Além disso, em *N. granulata* a exposição à anoxia por 4h reduziu a captação de glicose e a síntese de glicogênio no hepatopâncreas, que foram acompanhadas pelo aumento na mobilização de glicogênio e na atividade da enzima glicogênio fosforilase (Oliveira e cols., 2001). Recentemente, Geihs e cols. (2013b) constataram diminuição no consumo de oxigênio e na atividade locomotora de *N. granulata* após exposição de 1, 4 e 10 horas ao meio hipóxico.

Algumas estratégias utilizadas pelos crustáceos durante a hipóxia são bem conhecidas, entretanto, os mecanismos utilizados durante a reoxigenação ainda não são bem compreendidos. Este processo é de grande importância, pois é durante a recuperação que as reservas de energia são restauradas e os produtos finais acumulados são removidos do organismo. No entanto, o processo de reoxigenação quando o animal retorna à normóxia pode induzir danos oxidativos. De Oliveira e cols. (2005), estudando o efeito da anoxia e da recuperação da anoxia sobre o balanço oxidativo em tecido branquial de *N. granulata*, demonstraram que este caranguejo, como outras espécies intertidais que estão sujeitas aos ciclos naturais de anoxia/hipóxia e reoxigenação (Lutz e Storey, 1997; Childress e Seidel, 1998; Hochachka e Lutz, 2001; Hermes-Lima e Zenteno-Savín, 2002; Gorr e cols.,

2010), apresenta estratégias adaptativas de defesa antioxidante que permitem a esses animais sobreviverem em ambientes com extremas variações das características físico-químicas.

Em *N. granulata* mantidos com dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos ao estresse por anoxia ou hipóxia ambiental durante 8 horas, as concentrações de lactato e de glicose na hemolinfa aumentam 10-14 vezes, quando comparadas àquelas constatadas nos grupos em normóxia (Oliveira e cols., 2001; Maciel e cols., 2008). Durante a fase de recuperação da anoxia, a concentração de lactato na hemolinfa de caranguejos alimentados com dieta HP retornou rapidamente a valores semelhantes àqueles do grupo normóxia. Entretanto, nos caranguejos alimentados com a dieta HC o decaimento dos níveis de lactato na hemolinfa foi lento quando comparado àquele verificado nos caranguejos alimentados com dieta HP (Oliveira e cols., 2004). Esta redução do lactato hemolinfático em caranguejos alimentados com a dieta HP foi acompanhada de aumento na incorporação do ^{14}C -lactato em glicose no hepatopâncreas e no músculo (Oliveira e cols., 2004; Maciel e cols., 2008). A participação da gliconeogênese muscular a partir de lactato nos animais que receberam a dieta HP, ocorreu pelo aumento na atividade e na expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Ao contrário, nos animais que receberam uma dieta HC a capacidade gliconeogênica a partir do lactato não foi ativada, explicando, em parte, a mais lenta redução dos níveis de lactato circulante constatado neste grupo alimentar (Maciel, 2007; Maciel e cols., 2008).

Em músculo de *N. granulata* alimentado com a dieta HP a atividade da enzima PK no período de recuperação pós-anoxia de 3 h apresenta valores 3 vezes maiores que aqueles verificados no grupo controle. Já nos caranguejos HC os va-

lores de atividade da PK muscular são menores que aqueles dos animais do grupo normóxia (Marqueze e cols., 2006). Contrariamente, no hepatopâncreas do grupo de caranguejos alimentados com a dieta HC a atividade da enzima PK manteve-se significativamente mais elevada que no grupo normóxia após 3h de recuperação pós-anoxia. Porém, nos caranguejos mantidos com a dieta HP a atividade dessa enzima retornou, após 3h de recuperação pós-anoxia, a valores semelhantes àqueles do grupo normóxia (Marqueze e cols., 2011). A manutenção da atividade da via glicolítica durante o período de recuperação no hepatopâncreas do grupo HC e no músculo do grupo HP contribuiu para o retorno das reservas de ATP a valores semelhantes àqueles dos grupos controle em ambos os tecidos (Marqueze e cols., 2006; 2011).

Nos caranguejos mantidos com a dieta HC, a síntese de glicogênio no hepatopâncreas, a partir de glicose, seria uma das vias envolvidas na redução dos valores de glicose circulante constatado no período de 3h pós-anoxia (Marqueze e cols., 2011).

Como exposto acima, diversos estudos têm investigado as estratégias metabólicas de tolerância à anoxia, hipóxia e reoxigenação utilizadas pelo caranguejo *N. granulata*, permitindo sua sobrevivência às variações do teor de oxigênio em seu habitat e suas incursões ao meio terrestre em busca de refúgio e de alimento. No presente trabalho foram investigadas as estratégias metabólicas de reorganização de prioridades para o uso de energia em caranguejos expostos a diferentes tempos de hipóxia e reoxigenação, além de determinar a expressão gênica do HIF-1 α e sua relação com essas respostas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi ampliar o entendimento das estratégias metabólicas e moleculares utilizadas para a reorganização do consumo energético nos diferentes tecidos do caranguejo *Neohelice granulata* em resposta a exposição ao meio hipóxico por 1h ou 8h e a períodos de reoxigenação de 3h ou 24h.

Objetivos específicos

Verificar o efeito da exposição dos animais à hipóxia e a recuperação pós-hipóxia sobre:

1. Os níveis hemolinfáticos de glicose e de lactato;
2. A concentração tecidual de ATP;
3. A atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase e a síntese de proteínas a partir de leucina marcada radioativamente, processos que demandam altas quantidades de ATP celular;
4. A capacidade de oxidação de substratos energéticos, pela medida da formação de ¹⁴CO₂ a partir de piruvato marcado radioativamente;
5. A expressão gênica do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

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

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

No laboratório, os caranguejos foram submetidos a choque hiposmótico com água destilada por 24 horas, para eliminação de possíveis parasitas e limpeza do conteúdo estomacal (Kucharski, 1990). Após este procedimento, os animais foram mantidos por 10 dias em tanque contendo água com salinidade de 20‰, temperatura de 25 °C, fotoperíodo natural, aeração constante (155 Torr de O₂ dissolvido na água, aproximadamente 9mg O₂/L). Os caranguejos foram alimentados, *ad libitum*, com carne bovina crua, duas vezes por semana.

3.2. Procedimentos Experimentais

Para o estudo da hipóxia foram utilizados aquários de 20L com 38 Torr (aproximadamente 2,2mg O₂/L) de oxigênio dissolvido na água. A redução do nível de oxigênio foi obtida por aeração com gás nitrogênio na água dos aquários e monitorada com o auxílio de um oxímetro (World Precision Instruments modelo Oxel-

1/ISSO₂). Quando o teor de oxigênio na água chegou ao valor desejado, os animais foram colocados nos aquários e os mesmos vedados. A partir deste momento foram contados os tempos experimentais de 1 ou 8 horas de hipóxia. Para cada tempo experimental, uma parte dos animais submetidos à hipóxia foi repassada para outros aquários com água em normóxia (155 Torr de O₂ dissolvido na água) por 3 ou 24 horas, para o estudo da recuperação da hipóxia (Tabela 1). O grupo controle permaneceu em normóxia (155 Torr de O₂ dissolvido na água) (Maciel e cols., 2008).

| Normóxia \Longrightarrow Hipóxia \Longrightarrow Recuperação | | |
|---|---------------------------------|----------------------------------|
| 155 Torr de O₂ | 38 Torr de O₂ | 155 Torr de O₂ |
| 10 dias | 1 hora | 3 ou 24 horas |
| | 8 horas | 3 ou 24 horas |

Tabela 1: Representação esquemática do desenho experimental.

Ao final dos períodos experimentais, os animais foram imediatamente crioadestesiados e amostras das brânquias anteriores e posteriores, músculo da mandíbula e hepatopâncreas foram coletadas e utilizadas nos diferentes protocolos experimentais. A hemolinfa desses animais foi coletada (anticoagulante oxalato de potássio 10%) das articulações do 4^o e 5^o pereiópodes e utilizada para as determinações bioquímicas de glicose e lactato.

3.3. Determinações Bioquímicas

3.3.1. Determinação da conversão de [U-¹⁴C]-leucina em ¹⁴C-proteínas

A síntese de proteínas foi determinada segundo Richardson e cols. (1997). Amostras de tecido (40-100mg) dos caranguejos foram incubadas em 500µL de solução fisiológica de caranguejo (SFC): 300mM NaCl, 10mM KCl, 25mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, 8,8mM H₃BO₃, pH 7,4; acrescida de 10mM HEPES, 0,1mM fenilnetilsulfonil fluoride (PMSF), contendo 0,2µCi de [U¹⁴C]-leucina (315mCi/mmol, Amersham International) e 5mM de leucina não marcada. Os tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5, v/v) por 30 segundos e incubados em banho metabólico por 180 minutos, com agitação constante e temperatura de 25 °C. Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram que a capacidade de síntese de proteínas é linear até 6 horas de incubação (Schein, 1999). Após a incubação as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, as amostras foram lavadas com SFC gelada, secas em papel filtro e transferidas para tubos contendo 500µL de água destilada. As amostras foram homogeneizadas com um macerador de tecidos (Omni Mixer). Uma parte das amostras (50µL) foi processada para a quantificação das proteínas totais (Bradford, 1976) e a outra parte processada para a quantificação total de ¹⁴C-proteínas.

Para a quantificação das ¹⁴C-proteínas sintetizadas, 100µL do homogeneizado foram aplicados em papel filtro Whatman 3MM e, após a secagem, os filtros foram incubados com TCA 10% por 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das ¹⁴C-proteínas. A seguir, os filtros foram lavados duas vezes com álcool 95% e duas vezes com éter. Após secos, os filtros foram colocados em vials contendo 3mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade quantificada em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os

resultados foram expressos como μmol de ^{14}C -leucina incorporada em ^{14}C -proteína. mg^{-1} de proteína. tempo^{-1} de incubação.

3.3.2. Determinação da formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -ácido pirúvico

A determinação da produção de $^{14}\text{CO}_2$ foi realizada conforme método descrito por De Oliveira e cols. (2002). Amostras de tecido dos caranguejos foram adicionadas em frascos de vidro com tampa de borracha contendo $500\mu\text{L}$ de meio de incubação constituído de solução fisiológica de caranguejo, PMSF (1%), $0,2\mu\text{Ci}$ de $[1-^{14}\text{C}]$ -ácido pirúvico ($18\text{mCi}/\text{mmol}$, Perkin Elmer) e 5mM de ácido pirúvico não marcado. Nas tampas de borracha foi acoplado um vidro em formato de “J” com um poço onde era colocado uma tira de papel Whatman 3MM para a captação do $^{14}\text{CO}_2$ resultante da oxidação do ácido pirúvico. Os frascos foram aerados com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$, 95:5, v/v) por 30 segundos e as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme. Após foi feita a incubação em banho metabólico (Dubnoff) por 1h a 25°C com agitação constante. A reação de oxidação foi interrompida injetando-se $0,25\text{mL}$ de TCA 50% no meio de incubação, através da tampa de borracha, e nos poços foi injetado $0,25\text{mL}$ de NaOH 2M, umedecendo as tiras de papel. Os frascos permaneceram lacrados e imóveis por 12 horas para promover a total fixação do $^{14}\text{CO}_2$ nas tiras de papel. Após este período, a tira de papel 3MM era transferida para um novo frasco contendo 3mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade quantificada em espectrômetro de cintilação líquida LKB-Wallac. Os resultados foram expressos como μmol de $^{14}\text{CO}_2$ formado a partir de $[1-^{14}\text{C}]$ -ácido pirúvico. mg^{-1} de tecido. h^{-1} .

3.3.3. Determinação da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase (E.C. 3.6.1.3)

Para determinar a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, o isolamento das membranas foi realizado conforme o método descrito por Barnes e Blackstock (1993). Amostras de tecido (300mg) foram homogeneizadas (Omni Mixer) em solução tampão (Tris-HCl 1,35M, PMSF 1%, pH 7,4) na proporção 1:5 (p:v). O homogeneizado foi centrifugado (10000xg, 4°C) por 10 minutos e o sobrenadante foi centrifugado a 40000xg, 4°C por 25 minutos. O precipitado foi ressuspenso com 1mL do mesmo tampão de homogeneização (Tris-HCl) e novamente centrifugado a 40000xg, 4°C por 20 minutos. O precipitado obtido foi ressuspenso com 500µL de tampão Tris-HCl e, antes de ser congelado (-20°C) por 12 horas, uma amostra de 50µL era reservada para determinar a concentração de proteínas.

A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi determinada conforme o método descrito por Esmann (1988) e todo o processo de incubação foi realizado em sala escura. Foram elaborados dois meios de incubação, A e B, constituídos por NaCl (1M), MgCl₂ (60mM), KCl (100mM) e EDTA (1mM), pH 7,4, sendo que 30mM de ouabaína, um inibidor específico da Na⁺/K⁺-ATPase, foram adicionados somente no meio de incubação B. As amostras (50mg de proteína) foram pré-incubadas (30°C) por 5 minutos em tubos com os meios de incubação A e B, e após este período foi adicionado 20µL de ATP (30mM) em cada tubo e, após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 200µL de TCA 10%. Para cada amostra foram preparados brancos contendo os mesmos meios de incubação A e B, porém sem a adição da amostra, para descontar os valores de fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise do ATP devido a outros fatores e não pela atividade da Na⁺/K⁺-ATPase.

O fosfato inorgânico (Pi) foi determinado conforme o método descrito por Chan e Swaminathan (1986). Foi preparada uma solução reagente com verde malaquita, água MilliQ, molibdato de amônio e álcool polivinílico na proporção 2:2:1:1 (v:v:v:v). A quantificação do Pi das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 630nm. Foi utilizada uma curva padrão com K_2HPO_4 (fosfato de potássio monobásico) para o cálculo da concentração de Pi das amostras e, a atividade da Na^+/K^+ -ATPase foi calculada pela diferença na concentração de Pi entre os meios de incubação A e B, e seus respectivos brancos, e os resultados expressos como $\mu\text{mol de Pi.mg}^{-1}$ de proteína. min^{-1} .

3.3.4. Determinação de ATP tecidual

Para a determinação da concentração de ATP tecidual, os animais eram cri-anestesiados e as amostras (100mg) de tecido eram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em *freezer* -80°C . Após, as amostras eram homogeneizadas em tampão contendo: TCA 6 %, NaF 20 mM, gelatina $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração de ATP determinada através da técnica da luciferina bioluminescente com kit da Invitrogen (A22066). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol de ATP.mg}^{-1}$ de tecido. Os ensaios foram realizados poucos dias após a coleta das amostras de tecidos para minimizar a queda dos valores devido ao tempo de armazenamento a -80°C (Souza e cols., 2013).

3.3.5. Determinação das proteínas

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

3.3.6. Determinação das concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa

As concentrações hemolinfáticas de glicose e lactato foram determinadas através dos testes colorimétricos enzimáticos Glicose Liquiform® (Labtest Diagnóstica) e Lactato (Katal), respectivamente.

3.3.7. Determinação da expressão gênica do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α)

3.3.7.1 Desenho das sequências sintéticas (*primers*)

Os *primers* específicos do HIF-1 α e do 18S, este último utilizado como gene endógeno normalizador, foram desenhados a partir das regiões mais conservadas após alinhamento de múltiplas sequências genéticas de diferentes espécies de crustáceos e de peixe-zebra, uma vez que as sequências parciais dos genes HIF-1 α e 18S do caranguejo *N. granulata* ainda não estão disponíveis no *GenBank*. O alinhamento foi executado no programa Clustal X, e as sequências utilizadas possuem os seguintes números de acesso no GenBank:

HIF-1 α

- *Callinectes sapidus* (JN673810)
- *Cancer magister* (DQ535030)
- *Litopenaeus vannamei* (FJ807918)
- *Palaemonetes pugio* (AY655698)
- *Oratosquilla oratoria* (HM32914)

18S

- *Callinectes sapidus* (M34360)
- *Litopenaeus vannamei* (EU920969)
- *Danio rerio* (FJ915075)

Após o alinhamento e definição das regiões mais conservadas, os *primers* para cada gene foram desenhados utilizando o programa IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc.), obtendo as seguintes sequências:

- HIF-1 α (195pb): 5'-TTCCTTCGCCTCAAGTGCAC-3'
3'-GCTCACGAAGGTCTGCTTGTC-5'
- 18S (135pb): 5'-GGAAGTATGGTTGCAAAGCTG-3'
3'-TCTCAATCTGTCAATCCTTCCG-5'

3.3.7.2 Extração de RNA

Cerca de 50-100mg de tecido foram coletados e congelados em nitrogênio líquido dentro de tubos previamente autoclavados e livres de RNase, e mantidos em *freezer* a -80°C até o momento da utilização dos tecidos para a extração do RNA. A extração de RNA foi realizada macerando os tecidos em 1mL de Trizol (Invitrogen). Após a incubação à temperatura ambiente, ao precipitado foram adicionados 0,2mL de clorofórmio (MERCK) para cada 1mL de Trizol. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 12000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para outro tubo e o RNA foi precipitado em 0,5mL de álcool isopropílico (MERCK) para cada 1mL de Trizol. A mistura da solução foi feita por inversão e após a incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado de RNA foi adicionado 1mL de etanol 75%. As

amostras foram agitadas e centrifugadas a 7500xg por 5 minutos a 4°C. Após secagem à temperatura ambiente, foram adicionados 20µL de água livre de RNase para dissolução do RNA. A concentração de RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000; Thermo Scientific) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm e a integridade e a qualidade das preparações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em TBE. O material foi estocado em freezer a -20°C até o processamento para a obtenção de cDNA.

3.3.7.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita por meio de uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado, utilizando o *Kit First Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen). Na primeira fase do processo, as amostras de RNA foram desnaturadas a 65°C por 5 minutos em uma solução contendo: 2µg de RNA, 1µL de Random Hexamers, 1µL de Annealing Buffer e água até completar um volume final de 8µL. Após este período as amostras foram incubadas no gelo por 1 minuto. A segunda fase consistiu em adicionar 10µL de 2x First Strand Reaction Mix e 2µL da enzima SuperScript III. Uma nova incubação foi realizada em termociclador Veriti Thermal Cycle (Applied Biosystems) a 25°C por 10 minutos, seguida de outra incubação a 50°C por 50 minutos e concluindo com uma última incubação a 85°C por 5 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até a realização do ensaio para quantificação do RNA mensageiro.

3.3.7.4 Sequenciamento genético

Para o sequenciamento do gene endógeno constitutivo 18S foi utilizado produto de PCR, amplificado a partir de *mix* de cDNA de diferentes amostras de *N. granulata*. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti Thermal Cycle (Ap-

plied Biosystems) com 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por um minuto e extensão a 72 °C por 30 segundos. O produto amplificado foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 2% em TBE e visualizado através de luz ultravioleta no aparelho Geliance 600 Image System (Perkin Elmer). A banda, cujo tamanho (135pb) correspondia ao esperado, foi então retirada do gel com auxílio de bisturi, colocada em tubo de 1,5mL e purificada com o kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega) conforme protocolo do fabricante. Após, foi feita a quantificação do DNA e 30ng do mesmo foram repassados para tubos de 0,5mL, onde foram adicionados 4,5pmoles de *primer* específico (18S *forward* ou *reverse*) e água até completar um volume final de 6µL. As amostras foram encaminhadas à empresa Ludwig Biotecnologia Ltda (Centro de Biotecnologia/UFRGS) para execução do sequenciamento. A análise do sequenciamento confirmou que o fragmento amplificado correspondia a um segmento do gene 18S.

Sequenciamento e alinhamento com 18S de *C. sapidus*:

```

Callinectes sapidus_18S: GGAAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAA
Neohelice granulata_18S: -----AAATTTAAGGGA
                               ** ** ***** *

Callinectes sapidus_18S: TTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTG
Neohelice granulata_18S: TTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTG
                               *****

Callinectes sapidus_18S: CGGCT-TAATTTGACTCAACACGGGGAACCTCAC
Neohelice granulata_18S: CGGCTATATTTTGACCCAGCACGGGGAACCTCAC
                               ***** ** ***** ** *****

Callinectes sapidus_18S: CAGGCCAGACACCGGAAGGATTGACAGATTGA
Neohelice granulata_18S: CAGGCC-AGACAGCGTAAGATTTGACAGATGAG
                               ***** ***** ** ** *****

Callinectes sapidus_18S: GA-
Neohelice granulata_18S: AAA
                               *

```

O sequenciamento do gene HIF-1α demonstrou a homologia com as sequências de outros crustáceos. No entanto, por ter sido realizada uma única reação de sequenciamento a partir de produto de PCR, a qualidade do resultado não foi

satisfatória, sendo necessária a realização de outras reações de sequenciamento até termos a certeza da posição de todas as bases.

3.3.7.5 Quantificação do RNA mensageiro por PCR em Tempo-Real (qPCR)

Cada amostra de 1 μ L do cDNA (diluição 1:10) foi adicionada a uma solução contendo as sequências sintéticas específicas (*primers*) (5 μ M), sendo 0,8 μ L (0,1 μ M) do primer 18S e 1,6 μ L (0,2 μ M) do primer HIF-1 α ; 2 μ L de Buffer (10x); 1,2 μ L de MgCl₂ (50mM); 0,2 μ L de dNTPs (10mM); 2 μ L de Sybr Green (100x); 0,05 μ L Taq Platinum (5UN/ μ L) e água até completar um volume final de 20 μ L por poço em placa MicroAmp Fast Optical Reaction Plate (Applied Biosystems).

As placas foram incubadas no aparelho Step One PlusTM (Applied Biosystems) e submetidas a uma fase inicial de ativação da enzima (*Hot Start*) a 94 °C por 5 minutos. As sequências alvo foram então amplificadas durante 40 ciclos constituídos de etapas sucessivas de desnaturação (94 °C por 15 segundos) e de anelamento (58 °C por 30 segundos).

Após a amplificação, o produto da reação foi submetido a uma fase de dissociação (*Melting*), onde a temperatura variou de 58 °C a 99 °C e a fluorescência foi adquirida a cada 0,4 °C, registrando-se a temperatura de dissociação ou desnaturação da dupla fita do material amplificado, o que indica o tamanho e, portanto, a especificidade do produto amplificado em cada reação. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa Step One Software versão 2.0.

3.3.7.6. Cálculo da expressão relativa

A quantificação da expressão dos genes estudados neste trabalho em cada amostra foi estimada através do método comparativo do *Cycle Threshold* (cT). A

quantidade de gene alvo foi normalizada pelo gene controle endógeno 18S para as correções de pequenas variações devido à diferença na quantidade de RNA total.

Pelos valores do cT calcula-se o delta cT (ΔcT) para cada amostra de mRNA, que consiste na diferença entre os cT do gene de interesse e do gene constitutivo.

$$\Delta cT = cT_{(\text{gene alvo})} - cT_{(\text{gene endógeno})}$$

A expressão dos genes entre vários grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o ΔcT das amostras em diferentes condições experimentais e o ΔcT do grupo controle (calibrador).

$$\Delta\Delta cT = \Delta cT_{(\text{teste})} - \Delta cT_{(\text{calibrador})}$$

A expressão relativa, portanto, é igual a $2^{-\Delta\Delta cT}$. Como calibrador utilizamos o valor da média dos ΔcT das amostras do grupo controle (normóxia).

Os resultados foram expressos como a relação entre a expressão dos mRNAs de HIF-1 α e 18S, sendo os valores do grupo normóxia normalizados para 1. Para a comparação da expressão de HIF-1 α entre os tecidos do grupo normóxia, o hepatopâncreas foi utilizado como referência, e o seu valor também foi normalizado para 1.

3.4. Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos o desvio padrão da média (média \pm DPM) ou o erro padrão da média (média \pm EPM). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação Student-Newman-Keuls (SNK), após confirmação da homogeneidade e normalidade

dos dados. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ e os testes foram realizados utilizando o programa estatístico SigmaStat 3.5.

4. RESULTADOS

Os estresses hipóxicos por 1h e 8h aumentaram os níveis de glicose na hemolinfa em cerca de 2 e 11 vezes ($p < 0,05$), respectivamente, comparados aos níveis observados no grupo controle. Durante a fase de recuperação pós-hipóxia, os níveis glicêmicos de ambos os grupos retornaram a valores similares aos encontrados nos animais que permaneceram em normóxia (Tabela 2).

A concentração de lactato na hemolinfa dos caranguejos submetidos à hipóxia por 1h aumentou cerca de 3 vezes ($p < 0,05$) em relação ao grupo normóxia, enquanto que após 8h de hipóxia esse valor chegou a 37 vezes ($p < 0,05$) comparados aos valores de normóxia.

Após 3h de recuperação, os animais expostos à 1h de hipóxia exibiram uma concentração de lactato similar à encontrada no grupo controle; enquanto nos caranguejos submetidos à hipóxia por 8h, os níveis hemolinfáticos de lactato permaneceram altos (19 vezes, $p < 0,05$). Entretanto, às 24h de reoxigenação após ambos os tempos de estresse hipóxico, a concentração de lactato nestes animais atingiu valores inferiores ($p > 0,05$) aos observados para o grupo normóxia (Tabela 2).

Tabela 2: Concentrações de glicose (mmol.L⁻¹) e lactato (mmol.L⁻¹) na hemolinfa de caranguejos *N. granulata* submetidos à hipóxia (1h e 8h) e recuperação pós-hipóxia (3h e 24h). Valores expressos como a média ± DPM de 3-11 amostras. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

| | Glicose (mmol.L ⁻¹) | | Lactato (mmol.L ⁻¹) | |
|----------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| | 1h hipóxia | 8h hipóxia | 1h hipóxia | 8h hipóxia |
| Normóxia | 0,20 ± 0,13 | 0,20 ± 0,13 | 0,58 ± 0,78 | 0,58 ± 0,78 |
| Hipóxia | 0,38 ± 0,17 ^a | 2,31 ± 1,14 ^a | 1,87 ± 0,68 ^a | 21,67 ± 10,17 ^a |
| Rec 3h | 0,15 ± 0,03 ^b | 0,22 ± 0,09 ^c | 0,45 ± 0,39 ^b | 11,12 ± 6,88 ^{ac} |
| Rec 24h | 0,27 ± 0,13 | 0,19 ± 0,08 | 0,26 ± 0,09 | 0,17 ± 0,15 ^d |

^a - valores médios diferentes do grupo controle (normóxia) (p<0,05).

^b - valores médios diferentes do grupo hipóxia 1h (p<0,05).

^c - valores médios diferentes do grupo hipóxia 8h (p<0,05).

^d - valores médios diferentes do grupo recuperação 3h pós-hipóxia de 8h (p<0,05).

No músculo mandibular e nas brânquias anteriores dos caranguejos submetidos a ambos os tempos de estresse hipóxico (1h e 8h) não foram constatadas alterações significativas na síntese de ^{14}C -proteína. Contudo, após 24h de recuperação pós-hipóxia foi verificado um aumento de 3 vezes ($p < 0,05$) na incorporação de ^{14}C -leucina em ^{14}C -proteínas nas brânquias anteriores (Figura 2).

Após 1h de hipóxia, houve diminuição em cerca de 50% ($p > 0,05$) na incorporação de leucina em proteína e um aumento ($p < 0,05$), até valores próximos do grupo controle, durante a reoxigenação nas brânquias posteriores. Nos caranguejos submetidos à 8h de estresse hipóxico não foram constatadas alterações significativas na síntese proteica, contudo, após 24h de recuperação pós-hipóxia foi verificado um aumento de 3 vezes ($p < 0,05$) na incorporação de ^{14}C -leucina em ^{14}C -proteínas (Figura 2).

Assim como nos outros tecidos, foi observado um aumento de cerca de 90% ($p > 0,05$) na incorporação da ^{14}C -leucina em proteínas no músculo mandibular após 24h de recuperação pós-hipóxia de 8h. No entanto, neste mesmo tecido nos animais submetidos à 1h de hipóxia não foram observadas alterações significativas na capacidade de síntese de proteínas (Figura 2).

No hepatopâncreas houve diminuição ($p > 0,05$) na síntese proteica após 8h de hipóxia e, em seguida, um aumento linear ($r^2 = 0,99$) durante a fase de recuperação pós-hipóxia. Após 24h de reoxigenação esses valores foram 2,5 vezes maiores ($p < 0,05$) em relação ao grupo normóxia. Quando os caranguejos foram submetidos à hipóxia por 1h não foram constatadas alterações significativas na síntese de ^{14}C -proteínas, contudo, a partir das 3h de recuperação ocorreu uma diminuição ($p < 0,05$) que se manteve até às 24h de reoxigenação (Figura 2).

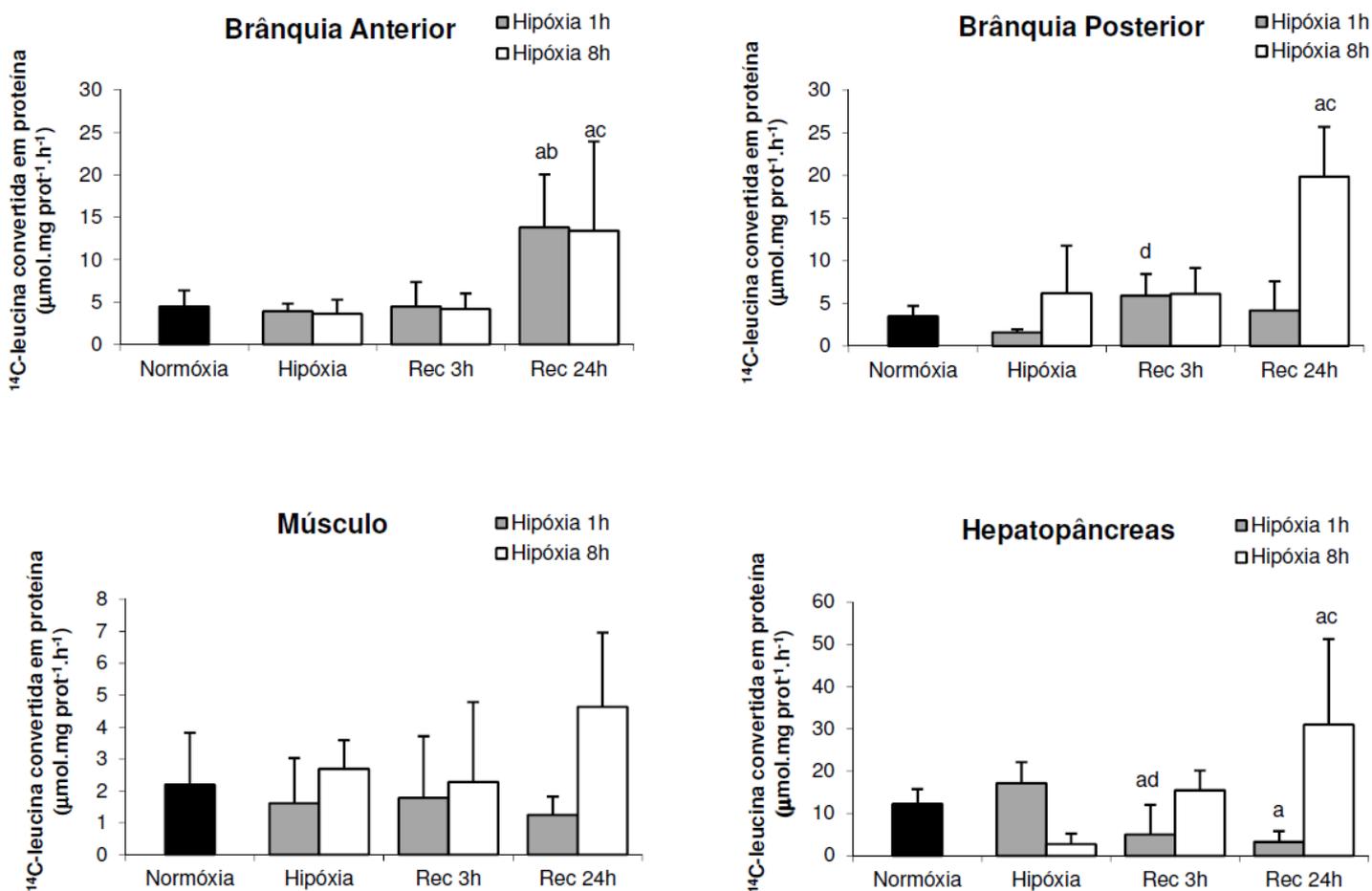


Figura 2: Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a conversão de ¹⁴C-leucina em ¹⁴C-proteína em tecidos do caranguejo *N. granulata* (n=4-8). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

^a - valores médios diferentes do grupo controle (normóxia) ($p < 0,05$).

^b - valores médios diferentes do grupo recuperação 3h pós-hipóxia de 1h ($p < 0,05$).

^c - valores médios diferentes do grupo recuperação 3h pós-hipóxia de 8h ($p < 0,05$).

^d - valores médios diferentes do grupo hipóxia 1h ($p < 0,05$).

Em *N. granulata* não foram observadas alterações significativas na produção de $^{14}\text{CO}_2$ em qualquer dos tecidos estudados durante os estresses hipóxicos de 1h e 8h em relação aos animais que foram mantidos em normóxia (Figura 3).

Contudo, após 24h de recuperação pós-hipóxia de 1h houve um aumento de cerca de 50% ($p < 0,05$) na oxidação de ^{14}C -ácido pirúvico nas brânquias anteriores, enquanto nos demais tecidos nenhuma alteração significativa foi observada nesse mesmo período de reoxigenação (Figura 3).

Nos caranguejos submetidos à recuperação pós-hipóxia de 8h foram constatadas diminuições entre 2 e 3 vezes ($p < 0,05$) na produção de $^{14}\text{CO}_2$ em todos os tecidos estudados (Figura 3).

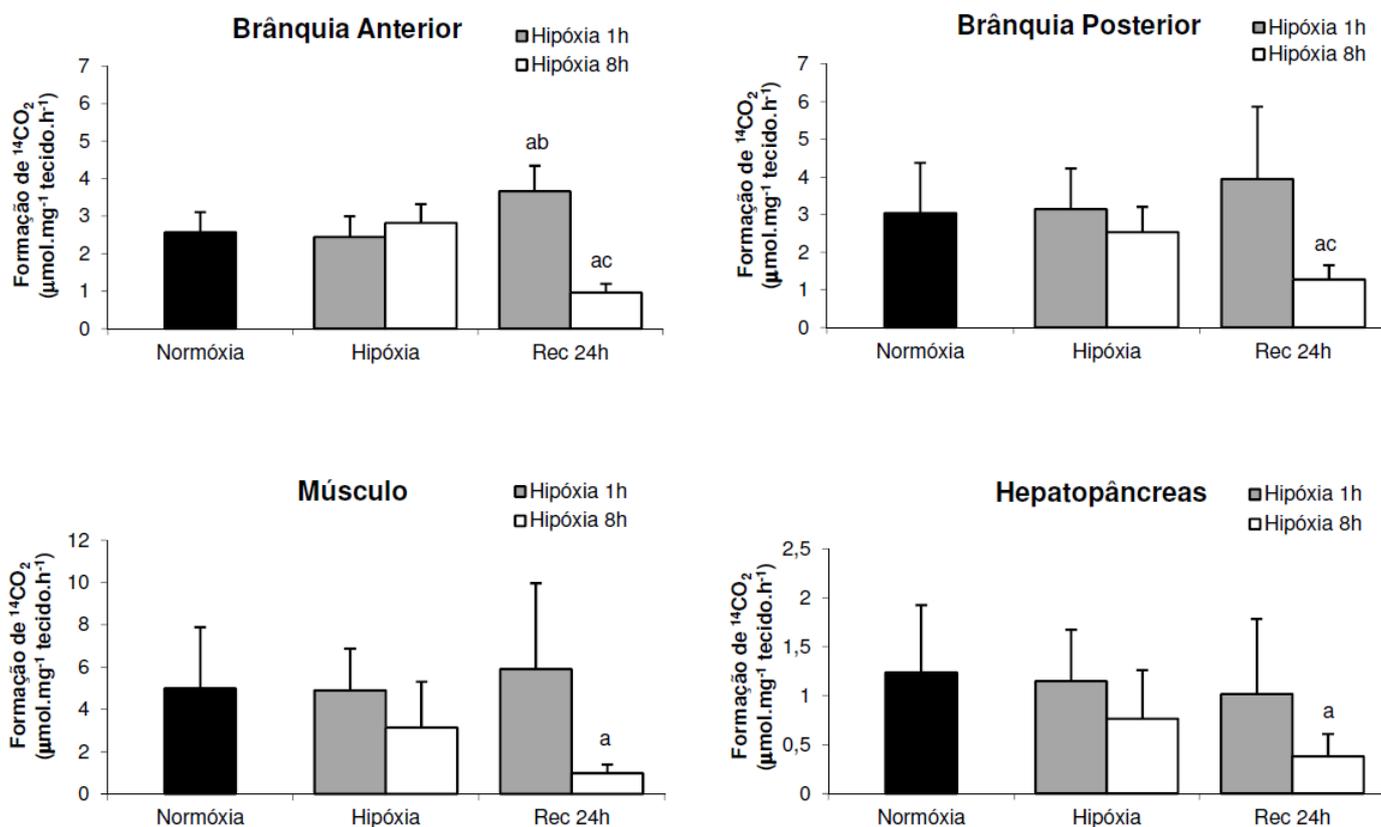


Figura 3: Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -ácido pirúvico em tecidos do caranguejo *N. granulata* (n=4-6). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

- a - valores médios diferentes do grupo controle (normóxia) ($p < 0,05$).
- b - valores médios diferentes do grupo hipóxia 1h ($p < 0,05$).
- c - valores médios diferentes do grupo hipóxia 8h ($p < 0,05$).

Nas brânquias anteriores de caranguejos expostos à hipóxia por 1h houve diminuição ($p < 0,05$) na atividade da Na^+/K^+ -ATPase em relação ao grupo controle durante o estresse hipóxico e as fases de reoxigenação. No entanto, após 8h de hipóxia não foram constatadas alterações significativas na atividade da enzima (Figura 4).

Durante a hipóxia por 1h e 8h houve diminuição em cerca de 38% na atividade da enzima em brânquias posteriores. Contudo, a partir das 3h de recuperação pós-hipóxia de 1h a Na^+/K^+ -ATPase manteve sua atividade reduzida, enquanto que nos animais submetidos à recuperação após 8h de hipóxia houve um aumento até valores próximos do grupo controle. Nestes mesmos animais, após 24h de reoxigenação, a atividade voltou a diminuir ($p < 0,05$) em relação ao grupo normóxia (Figura 4).

Em *N. granulata* submetidos ao estresse hipóxico por 1h houve diminuição ($p < 0,05$) na atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase no músculo mandibular, persistindo durante a fase de recuperação. No entanto, após 8h de estresse, a mesma enzima não apresentou alterações significativas em sua atividade (Figura 4).

No hepatopâncreas foi observada diminuição em cerca de 20% ($p < 0,05$) na atividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase apenas às 24h de recuperação pós-hipóxia de 1h. Contudo, nos caranguejos submetidos à 8h de hipóxia não houve alterações significativas na atividade da enzima durante o estresse e ao longo da fase de recuperação (Figura 4).

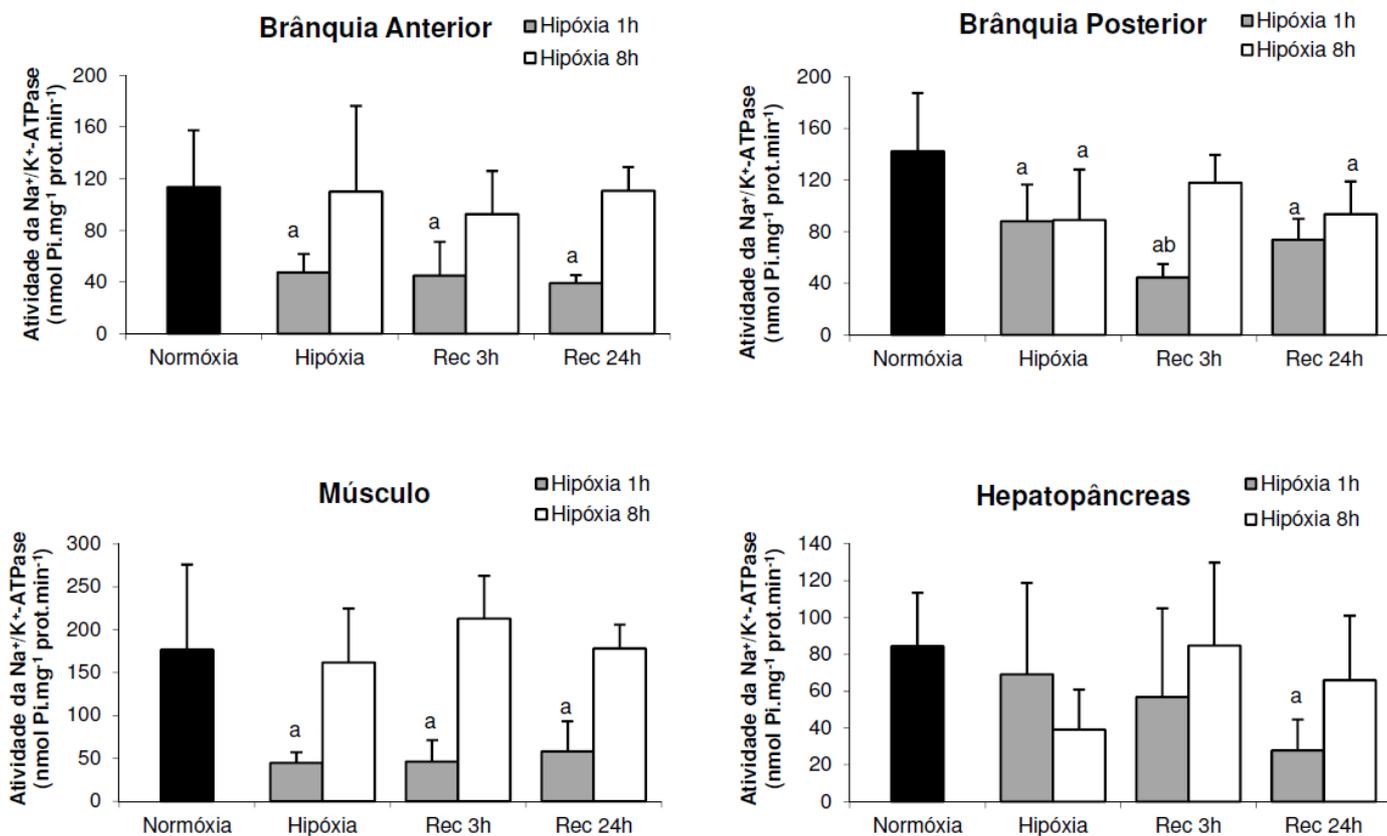


Figura 4: Atividade da Na^+/K^+ -ATPase durante a hipóxia e recuperação pós-hipóxia em tecidos do caranguejo *N. granulata* (n=6-12). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

^a - valores médios diferentes do grupo controle (normóxia) ($p < 0,05$).

^b - valores médios diferentes do grupo hipóxia 1h ($p < 0,05$).

Nenhuma alteração significativa na concentração de ATP foi observada em brânquias anteriores dos animais submetidos à hipóxia por 1h, inclusive durante a fase de recuperação pós-hipóxia. Porém, houve uma diminuição em cerca de 55% ($p < 0,05$) após 24h de reoxigenação após a exposição ao estresse hipóxico por 8h (Figura 5).

Quando os caranguejos foram submetidos à hipóxia por 1h houve uma diminuição linear ($r^2 = 0,99$) na concentração de ATP nas brânquias posteriores até às 24h de recuperação pós-hipóxia. Neste mesmo tecido, após 8h de estresse hipóxico, não foram observadas alterações significativas nos níveis de ATP, inclusive durante a fase de reoxigenação (Figura 5).

No músculo mandibular dos animais expostos por 8h à hipóxia não houve mudanças na concentração de ATP, inclusive na fase de reoxigenação. Entretanto, nos caranguejos submetidos à 1h de estresse, uma diminuição linear ($r^2 = 0,99$) foi constatada até às 24h de recuperação pós-hipóxia (Figura 5).

Em *N. granulata* submetido ao estresse hipóxico por 1h, não foram observadas alterações significativas na concentração de ATP no tecido hepatopancreático, inclusive durante a fase de recuperação pós-hipóxia. Entretanto, após 8h de hipóxia, os níveis de ATP diminuíram cerca de 75% ($p < 0,05$) e aumentaram ($p < 0,05$) até valores próximos aos do grupo controle durante o período de reoxigenação (Figura 5).

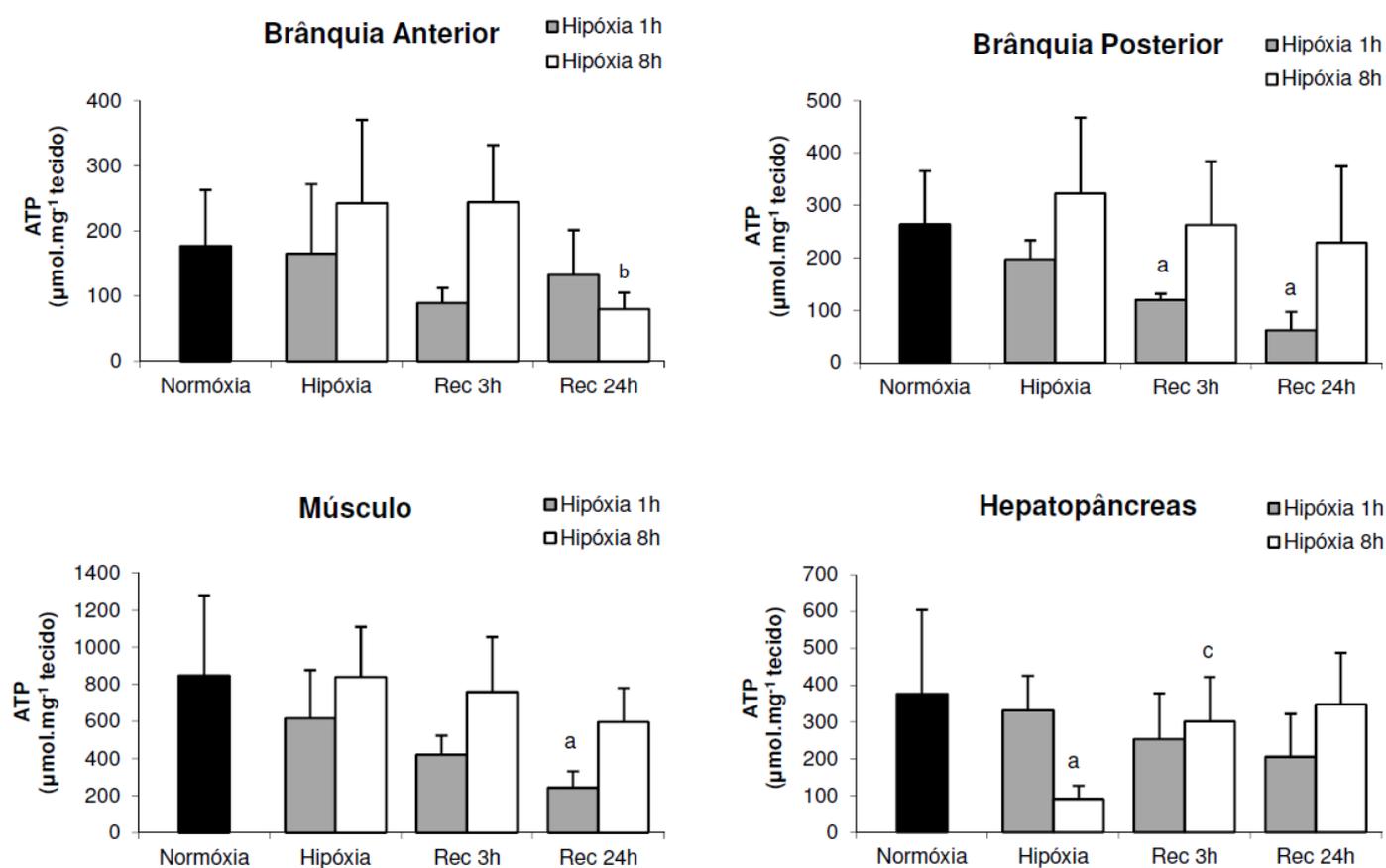


Figura 5: Concentração de ATP durante a hipóxia e recuperação pós-hipóxia em tecidos do caranguejo *N. granulata* (n=3-8). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

^a - valores médios diferentes do grupo controle (normóxia) ($p < 0,05$).

^b - valores médios diferentes do grupo recuperação 3h pós-hipóxia de 8h ($p < 0,05$).

^c - valores médios diferentes do grupo hipóxia 8h ($p < 0,05$).

Nas brânquias anteriores não foram constatadas alterações significativas na expressão gênica do HIF-1 α em caranguejos *N. granulata* submetidos à hipóxia por 1h. No entanto, durante a fase de recuperação pós-hipóxia a expressão desse gene diminuiu ($p>0,05$) cerca de 2,5 vezes (Figura 6).

Nas brânquias posteriores houve um aumento de aproximadamente 2 vezes ($p>0,05$) na expressão do HIF-1 α após 1h de hipóxia e uma diminuição ($p>0,05$), até valores próximos do grupo controle, durante a reoxigenação (Figura 6). No entanto, a grande dispersão dos dados e o número amostral reduzido requerem uma análise mais cautelosa desse resultado, sendo necessária a repetição do ensaio para este tecido, aumentando o número amostral para assim validar o resultado obtido.

Após 1h de exposição dos animais à hipóxia houve uma diminuição de 94% ($p<0,05$) na expressão gênica do HIF-1 α no músculo mandibular, que se manteve até às 24h de reoxigenação (Figura 6).

Quando os caranguejos foram submetidos à hipóxia por 1h não foram constatadas alterações significativas na expressão do HIF-1 α no hepatopâncreas, contudo, após 24h de reoxigenação houve um aumento de 4 vezes ($p>0,05$) na expressão desse fator (Figura 6).

Em normóxia, a expressão do HIF-1 α no músculo mandibular foi entre 2 a 2,5 vezes maior ($p>0,05$) comparado aos outros tecidos (Figura 7).

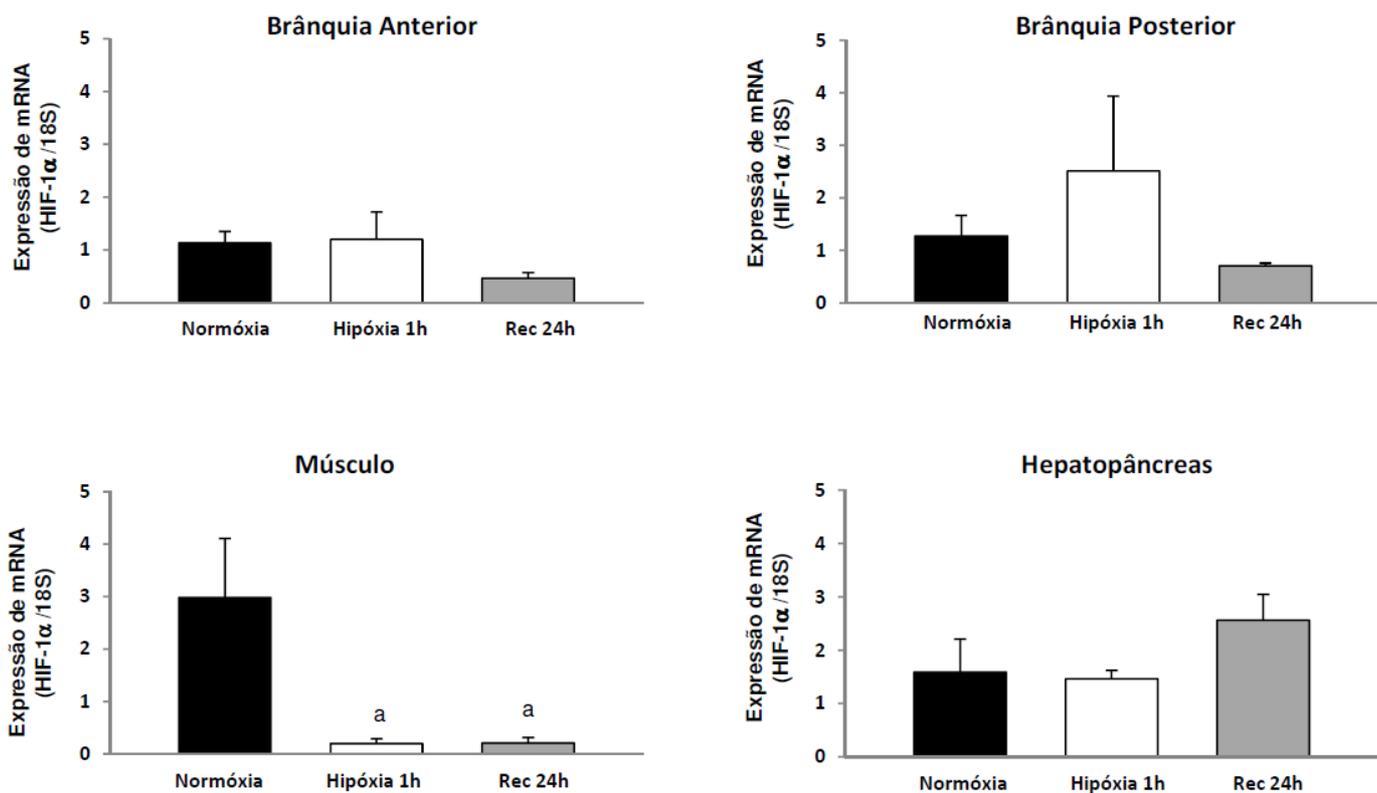


Figura 6: Efeito da hipóxia e da recuperação pós-hipóxia sobre a expressão gênica do HIF-1 α em tecidos do caranguejo *N. granulata* (n=4-6 poços). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm EPM. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

^a - valores médios diferentes do grupo controle (normóxia) ($p < 0,05$).

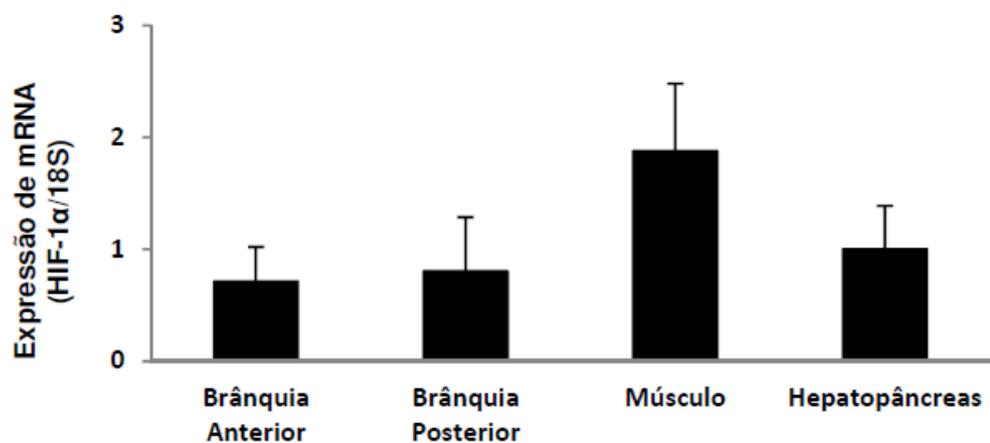


Figura 7: Comparação entre as expressões gênicas do HIF-1 α nos tecidos do caranguejo *N. granulata* em normóxia (n=6 poços). As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm EPM. Foi utilizada ANOVA 1 via, seguida de teste de comparação SNK.

5. DISCUSSÃO

Devido às características ecológicas e comportamentais o caranguejo *N. granulata* é um organismo bentônico excelente para o conhecimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nas estratégias de tolerância à hipóxia ambiental e a reoxigenação pós-hipóxia. O *N. granulata* apresenta uma baixa tolerância à hipóxia severa quando comparada àquela de outros crustáceos, como por exemplo, os camarões *Calinassa jamaicense* e *Calocaris macandreae* (Geihs e cols., 2013; Anderson e cols., 1994; Felder, 1979). Entretanto, possui uma rápida capacidade de recuperação pós-hipóxia, provavelmente, devido às variações bruscas de concentração de oxigênio dissolvido na água que ocorrem diariamente em seu habitat (Geihs e cols, 2013).

Estudos prévios em *N. granulata* demonstram que o aumento das concentrações hemolinfáticas de lactato e de glicose, a ativação das vias glicolítica e gliconeogênica a partir de lactato no músculo e no hepatopâncreas, a mobilização das reservas de glicogênio e de ATP tecidual são algumas das estratégias utilizadas para a manutenção da produção de energia em resposta à redução dos níveis de oxigênio no meio ambiente (Geihs e cols, 2013; Marqueze e cols., 2006; 2011; Maciel e cols., 2008; Oliveira e cols., 2004).

A utilização de estratégias comportamentais, respiratórias, circulatórias e alterações na afinidade da hemocianina ao O₂ já foram descritas em crustáceos durante a hipóxia ou a anoxia ambiental (Head, 2010). Hervant e cols. (1995) constataram uma redução do consumo de oxigênio e da atividade de locomoção no anfípodo *Niphargus rhenorhodanensis* exposto à hipóxia severa. Os mesmos efeitos foram observados em *N. granulata* após hipóxia ambiental (Santos e cols., 1987; Geihs e cols., 2013). Além disso, Gonçalves (1993) constatou uma diminuição da

frequência cardíaca em *N. granulata* quando submetido à anoxia ambiental durante doze horas.

No presente trabalho, a exposição dos caranguejos *N. granulata* ao estresse hipóxico por 1h mostra que estes animais também utilizam a estratégia de redução da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase nas brânquias anteriores e posteriores e no músculo mandibular para reduzir o gasto energético (figura 4). Esse efeito perdura inclusive durante as fases de reoxigenação, período em que as reservas energéticas são restauradas e os produtos finais são metabolizados ou removidos do organismo. A diminuição do gasto energético a partir da redução da atividade da enzima se evidencia pela manutenção dos níveis de ATP nesses tecidos durante a hipóxia (figura 5). Da mesma forma, no náutilo *Nautilus pompilius*, que sobrevive pelo menos 60h em hipóxia, não foi constatada diminuição na concentração de ATP nos músculos adutores durante o estresse hipóxico (Staples e Buck, 2009).

Recentemente, Geihs e cols. (2013) demonstraram que o caranguejo *N. granulata* submetido a diferentes tempos de hipóxia reduz marcadamente o consumo de oxigênio (VO₂) e a atividade locomotora. Entretanto, os resultados do presente trabalho mostram que a capacidade de síntese de proteínas (figura 2) e a capacidade de oxidação de piruvato (figura 3) não foram alteradas por 1h de hipóxia em *N. granulata*, sugerindo que nesses tecidos a estratégia utilizada na primeira hora de hipóxia é a redução do gasto energético via diminuição da atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase e do consumo de oxigênio (Geihs e cols., 2013). Este achado é reforçado pela constatação que no músculo locomotor de *N. granulata* submetido a diferentes tempos de hipóxia só foi verificada redução da atividade do complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial após 10 horas de hipóxia (Geihs e cols., 2013).

Em contraste, no tecido hepatopancreático de *N. granulata* a hipóxia de 1h não reduziu a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase (figura 4) e não alterou a concentração de ATP neste tecido (figura 5). Esta diferença de resposta entre os diferentes tecidos pode ser explicada, em parte, pela diferença de perfil metabólico entre o músculo, as brânquias e o hepatopâncreas. Em *N. granulata*, o hepatopâncreas é um tecido de reserva energética com concentrações elevadas de glicogênio e de lipídios que são armazenadas nos períodos de abundância de alimento como na primavera e no verão e durante a realimentação após o jejum (Kucharki e Da Silva, 1991; Vinagre e Da Silva, 1992; 2002). Em contraste, as brânquias (anteriores e posteriores), envolvidas na respiração, osmorregulação e excreção de substâncias tóxicas, e o músculo, envolvido principalmente na movimentação e gliconeogênese, são tecidos de alto gasto energético (Kucharski e Da Silva 1991; Vinagre e Da Silva, 1992; 2002). Assim, a redução da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase nesses tecidos seria uma das estratégias para reduzir o gasto de ATP pelo organismo em um ambiente onde as concentrações de oxigênio ambiental estão bastante reduzidas, mas a osmolaridade é mantida constante.

O uso preferencial das reservas de fosfagênios, a fim de manter uma elevada concentração de ATP, já foi observado em outros crustáceos e em moluscos (Gäde, 1983, 1984; Hervant e cols., 1995; Isani e cols., 1989; Da Silva-Castiglioni e cols., 2010) e poderia explicar a manutenção dos níveis de ATP tecidual verificada neste trabalho após 1h de hipóxia ambiental. Entretanto, Rossetti (2010) após submeter o caranguejo *N. granulata* ao estresse anóxico por 1h observou um aumento nas reservas de arginina e de arginina fosfato nas brânquias, no músculo mandibular e no hepatopâncreas. Considerando que durante a exposição à baixa tensão de oxigênio no ambiente, os organismos precisam mobilizar as reservas energéticas para au-

mentar a produção de energia (Lutz e Nilsson, 1997; Nilsson, 2001), a autora sugere que na primeira hora de anoxia o animal aumentaria as reservas de fosfagênios para serem usadas posteriormente, caso a falta de oxigênio ambiental perdure.

Outros trabalhos com *N. granulata* demonstraram que a exposição dos animais à hipóxia ou à anoxia ambiental aumenta marcadamente os níveis hemolinfáticos de glicose e de lactato (Gonçalves, 1993; Maciel *e cols.*, 2008; Marqueze *e cols.*, 2011; Oliveira *e cols.*, 2001; Rossetti, 2010). Estudos prévios mostram que após 1h de anoxia a via glicolítica no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentados com dieta de carne bovina está ativada; a atividade da enzima piruvato quinase (PK) está significativamente elevada quando comparada aquela do grupo normóxia (Marqueze *e cols.*, 2006; 2011). No presente trabalho um aumento significativo das concentrações de glicose e de lactato hemolinfático foi constatado após 1h de hipóxia, sugerindo a ativação da via glicolítica anaeróbica.

Genes e proteínas responsivos à hipóxia foram identificados no siri azul *Callinectes sapidus* (Brown-Peterson *e cols.*, 2005), sugerindo que indicadores moleculares podem ser utilizados para identificar sinais de exposição à hipóxia em crustáceos estuarinos (Brouwer *e cols.*, 2007). No presente estudo verificamos a expressão do gene do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α), responsável por mediar a ativação de algumas vias fisiológicas e bioquímicas utilizadas pelos tecidos em resposta à hipóxia.

No caranguejo *N. granulata* foi observado que, em normóxia, a maior expressão gênica do HIF-1 α ocorre no músculo mandibular, em comparação aos outros tecidos estudados (figura 7). Esse padrão diferenciado na expressão do HIF-1 α também foi observado em outros crustáceos. No camarão *Litopenaeus vannamei* em normóxia ou submetido à hipóxia ambiental o nível de mRNA da subunida-

de α do HIF-1 é maior nas brânquias que no hepatopâncreas e no músculo (Soñanez-Organis e cols., 2009). Recentemente, Hardy e cols. (2012) observaram que em *C. sapidus* submetido à hipóxia por 1h, a expressão de HIF-1 α foi tecido-específica e, no músculo, dependente do tipo de fibra muscular.

O HIF é um fator de transcrição que em vertebrados regula dezenas de genes envolvidos na resposta à hipóxia, incluindo a eritropoietina, o fator de crescimento vascular, as enzimas glicolíticas, a vasodilatação, a angiogênese e os transportadores de glicose (Harris, 2002; Semenza, 2001). As subunidades α e β dos genes do HIF são mantidas constitutivamente transcritas independentemente da tensão de oxigênio, mas somente o HIF-1 α é regulado de forma pós-traducional em vertebrados. O HIF-1 α contém duas regiões que modulam sua atividade em função da concentração de oxigênio do meio; um domínio dependente de degradação (ODD) e o domínio C-terminal de transativação (CTAD). Em normóxia, resíduos de prolina e de asparagina nestas regiões são hidroxilados por uma família de hidroxilases, esta modificação pós-traducional leva à rápida degradação do HIF-1 α (Ivan e cols., 2001; Jaakkola e cols., 2001). Em hipóxia, a hidroxilação é muito baixa o que leva ao acúmulo do HIF-1 α e sua interação com o HIF-1 β e consequente indução dos genes alvos.

No presente estudo, quando os caranguejos foram expostos ao estresse hipóxico por 1h a expressão do gene HIF-1 α no músculo diminuiu cerca de 90%, enquanto nos demais tecidos não ocorreram alterações significativas em relação ao grupo normóxia (figura 6). Em *L. vannamei* submetido a diferentes períodos de hipóxia uma marcante redução na expressão do HIF-1 α nas brânquias e no músculo também foi verificada, sendo dependente do tempo de estresse hipóxico (Soñanez-Organis e cols., 2009; 2010). Soñanez-Organis e cols. (2009) sugerem que a hipó-

xia aumentaria marcadamente a concentração da proteína HIF-1 α e essa exerceria uma retroalimentação negativa sobre os níveis de mRNA do HIF-1 α . Estudos prévios em nosso laboratório mostram que a anoxia por 1h aumentou significativamente a atividade da enzima PK e a mobilização das reservas de glicogênio no músculo de caranguejo *N. granulata* (Marqueze e cols., 2006). No presente trabalho os valores de glicose e de lactato são 1,9 e 3,2 vezes maiores, respectivamente, que aqueles verificados no grupo normóxia (tabela 2), sendo mantida uma relação entre lactato/glicose maior que 1 que é uma característica deste caranguejo (Pelegriño e cols., 2008). Em *L. vannamei* submetido à hipóxia por diferentes tempos, mas com o gene HIF-1 α e β silenciados, os níveis de glicose e de lactato hemolinfáticos foram significativamente menores que aqueles do grupo controle, sugerindo a participação deste gene na ativação da via glicolítica em crustáceos (Soñanez-Organis e cols., 2010). Assim como ocorreu nas brânquias anteriores e posteriores e no hepatopâncreas de *N. granulata*, Li e Brower (2007) constataram que os níveis de mRNA do HIF em *Palaemonetes pugio* não foram afetados pela hipóxia. Os autores sugerem que os níveis de HIF nesta espécie poderiam ser controlados pós-traducionalmente, como verificado nas isoformas HIF-1 α e HIF-2 α de vertebrados.

Os resultados do presente trabalho também sugerem que em *N. granulata* o HIF-1 α participaria da regulação metabólica da resposta à hipóxia, contudo, estudos mais específicos sobre a via glicolítica nos diferentes tecidos serão necessários para esclarecer esta hipótese.

Comparando-se o padrão de resposta metabólica de 1h de hipóxia com aquele de 8h de hipóxia nos diferentes tecidos, constatam-se diferenças marcantes entre os dois tempos.

Após 8h de hipóxia a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase nas brânquias anteriores e no músculo retornou a valores semelhantes àqueles verificados nos caranguejos em normóxia (figura 4). Entretanto, nas brânquias posteriores a atividade da enzima manteve-se cerca de 40% mais baixa que no grupo normóxia. Em brânquias posteriores de *N. granulata*, a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase é significativamente maior quando comparada àquela constatada em brânquias anteriores (Castilho e cols., 2001; Bianchini e cols., 2008; Freire e cols., 2008), devido à sua função osmorregulatória, assim, a manutenção de uma atividade enzimática reduzida seria uma estratégia para diminuir o gasto energético do organismo, salientando que ao longo das 8h de hipóxia os caranguejos foram mantidos em ambiente com osmolaridade controlada. Esta hipótese é reforçada pela manutenção das concentrações de ATP (figura 5) e de oxidação de piruvato (figura 3) em valores semelhantes àqueles do grupo normóxia. Além disso, a capacidade de síntese de proteínas não foi alterada (figura 2), pois as brânquias de crustáceos possuem um alto “turnover” de proteínas com elevada capacidade de síntese (Mente e cols., 2011); em *N. granulata* esta capacidade é 10 vezes maior em brânquias quando comparada ao músculo.

Em *N. granulata*, os três pares anteriores de brânquias são especializados na respiração e na excreção ativa de amônia (Genovese e cols., 2000; Luquet e cols., 2000; 2002). Diversos trabalhos têm demonstrado que a hipóxia ambiental aumenta a concentração hemolinfática de amônia em crustáceos (Schmitt e cols., 1998; Bernasconi e Uglow, 2008). Além disso, os caranguejos são alimentados no laboratório somente com carne bovina e esta dieta aumenta os níveis circulantes de ureia em *N. granulata*, indicando uma maior degradação de proteínas (Oliveira e Da Silva, 2000). Assim, a recuperação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase,

constatada após 8h de hipóxia nas brânquias anteriores, estaria relacionada a excreção ativa de amônia como foi verificado em outros crustáceos e em peixes (Weihrauch e cols., 2009). Entretanto, o retorno da atividade da enzima não alterou o consumo de ATP no tecido, pois a capacidade de oxidação de piruvato, provavelmente oriundo da glicose ou do lactato circulante, foi mantida às 8h de hipóxia em brânquias anteriores (figura 3).

No músculo mandibular, o retorno da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase a valores semelhantes àqueles do grupo normóxia (figura 4) e a manutenção da capacidade de síntese de proteínas (figura 2) também não modificaram os níveis de ATP (figura 5) após 8h de hipóxia. Além disso, Maciel e cols. (2008) verificaram um aumento de cerca de 3 vezes da atividade gliconeogênica a partir de lactato. Os autores também constataram às 8h de hipóxia uma redução marcante dos níveis de glicogênio e da oxidação de lactato no músculo mandibular, o que explicaria os níveis mais elevados de lactato circulante, cerca de 37 vezes, comparados àqueles verificados nos animais em normóxia (tabela 2). Contudo, no presente estudo, após 8h de hipóxia não foram constatadas alterações na oxidação de piruvato (figura 3), que, provavelmente, seria oriundo da utilização da glicose circulante ou de aminoácidos como alanina ou glicina, que apresentam concentrações elevadas na hemolinfa deste caranguejo (Schein, 1999), e explicariam a manutenção dos níveis de ATP no músculo mandibular. Geihs e cols. (2013) constataram uma marcante redução nos valores de ATP no músculo locomotor logo após a primeira hora de hipóxia, esta seria explicada pela diferença de função e de histologia entre o músculo locomotor e o mandibular.

O hepatopâncreas apresenta um padrão metabólico de resposta ao estresse hipóxico de 8h diferenciado daquele verificado nos outros tecidos estudados. Neste

tecido a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase não foi afetada pelas 8h de hipóxia (figura 4), assim como, a oxidação de piruvato (figura 3). Por outro lado, ocorre uma redução de 63%, porém não estatisticamente significativa, da síntese de proteínas (figura 2) e de 75% da concentração de ATP (figura 5) no hepatopâncreas. Oliveira e Da Silva (2004) demonstraram que em *N. granulata* submetido à anoxia ambiental por 8h ocorre um aumento da capacidade gliconeogênica hepatopancreática a partir de lactato, o que explicaria a redução dos níveis de ATP neste tecido.

O processo de recuperação pós-hipóxia é fisiologicamente importante, pois é neste período que as reservas energéticas são restauradas e os produtos finais acumulados são removidos.

Os caranguejos submetidos à 1h de hipóxia mantiveram, no músculo e nas brânquias anteriores e posteriores, nos períodos de recuperação estudados (3 e 24h), reduzido o gasto energético via bomba Na^+/K^+ -ATPase (figura 4), apesar do retorno da atividade locomotora e do consumo de oxigênio a valores de normóxia (Geihs e cols, 2013). Essa estratégia de reduzir o consumo de ATP via atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase na fase de recuperação pós-hipóxia provavelmente está relacionada ao custo metabólico do organismo em restaurar as reservas de energia e eliminar os produtos finais acumulados. Na recuperação, as brânquias anteriores aumentam a síntese de proteínas (figura 2), que sabidamente consome energia celular, suprida, em parte, pela oxidação de piruvato. Desta forma, a concentração de ATP tecidual foi mantida em valores similares àqueles do grupo normóxia (figura 5). Nas brânquias posteriores, apesar da redução do gasto de ATP via diminuição da atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase, a concentração de ATP no tecido foi utilizada no período de recuperação na manutenção da atividade deste órgão osmor-

regulador, como por exemplo, a síntese de proteínas, que apresenta valores mais elevados que durante a hipóxia de 1h.

Na fase de recuperação pós-hipóxia de 1h os níveis de mRNA do HIF-1 α nas brânquias posteriores não foram afetados pela reoxigenação (figura 6). Entretanto, nas brânquias anteriores e no músculo mandibular a expressão do HIF-1 α manteve-se reduzida durante o período pós-hipóxia de 1h, provavelmente, devido à alta concentração da proteína HIF-1 α celular. Esta hipótese é reforçada pelos resultados de Marqueze e cols. (2006) que após submeterem o *N. granulata* a anoxia de 1h e recuperação pós-anoxia de 3h constataram um aumento marcante da atividade da enzima PK no músculo mandibular, sugerindo a manutenção da atividade glicolítica no período de reoxigenação. Os mesmos autores também verificaram um aumento da oxidação de glicose neste tecido na recuperação pós-anoxia de 3h, o que é confirmado no presente trabalho pela manutenção dos valores de oxidação de piruvato semelhantes ao grupo normóxia (figura 3) e pela redução marcante da concentração de glicose na hemolinfa (tabela 2). Além disso, para reduzir o gasto energético o *N. granulata* mantém no músculo a atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase em níveis bastante baixos durante a fase de reoxigenação pós-hipóxia de 1h de hipóxia (figura 4).

No período de recuperação pós-hipóxia de 1h o hepatopâncreas diminui o gasto energético reduzindo a capacidade de síntese de proteínas (figura 2) e a atividade da bomba Na⁺/K⁺-ATPase (figura 4). A concentração de ATP tecidual foi mantida provavelmente via oxidação de piruvato. Marqueze e cols. (2011) constataram que após 3h de recuperação pós-anoxia de 1h um aumento marcante da síntese de glicogênio no hepatopâncreas. Neste mesmo período, no presente trabalho, constata-se uma redução marcante dos níveis de glicose circulante (tabela 2).

No período de recuperação pós-hipóxia de 8h não foi constatada redução da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (figura 4) e da síntese de proteínas (figura 2) nos tecidos estudados. Contrariamente, constata-se um aumento da capacidade de síntese de proteínas nesses tecidos. A redução na oxidação de piruvato nos tecidos (figura 3) reflete a volta dos valores de glicose e de lactato às concentrações semelhantes dos animais em normóxia (tabela 2). O aumento marcante da capacidade gliconeogênica e neoglicogeniogênica a partir de lactato no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* no período de recuperação pós-hipóxia de 8h também contribui para a redução dos níveis de lactato circulante a valores de normóxia (Maciel e cols., 2008; Oliveira e Da Silva, 2004) ou inferiores, como constatado no presente estudo (tabela 2). Além disso, *N. granulata* na fase de recuperação pós-hipóxia de 8h excreta lactato para o meio aquático (Maciel e cols., 2008).

Concluindo, *N. granulata* poderia ser classificado como um oxigênio conformador quando a hipóxia ocorre por período curto (1h), reduzindo o consumo de oxigênio e a capacidade de locomoção em resposta aos níveis de O_2 ambiental (Geihs e cols., 2013) e diminuindo o consumo de ATP via bomba Na^+/K^+ -ATPase. Em período de hipóxia mais prolongado, com os níveis de glicose e de lactato elevados, a atividade da bomba Na^+/K^+ -ATPase retorna a valores de normóxia, mas a redução na VO_2 e na atividade locomotora perdura (Geihs e cols., 2013), contudo, o animal possui substratos energéticos para enfrentar a redução de oxigênio no ambiente.

Na reoxigenação, as estratégias metabólicas para a restauração das reservas energéticas e a remoção dos produtos finais acumulados variam conforme os tempos de estresse hipóxico e de reoxigenação e, ainda, são tecido específicas.

Pela primeira vez em *N. granulata* demonstra-se o envolvimento do HIF-1 α na resposta ao estresse hipóxico e seu possível envolvimento com a mobilização de substratos energéticos, principalmente no músculo e no hepatopâncreas.

6. CONCLUSÃO

Em resumo, a redução na atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase durante a hipóxia por 1h e subsequentes períodos de reoxigenação indica que o caranguejo *N. granulata* apresenta uma estratégia de redução da demanda de ATP, garantindo assim sua sobrevivência em situações onde haja restrição na disponibilidade de oxigênio. No entanto, a manutenção da atividade enzimática em períodos mais prolongados de hipóxia (8h) demonstra que o animal utiliza estratégias alternativas para compensar o gasto energético com a atividade da Na^+/K^+ -ATPase.

A capacidade de síntese proteica a partir de ^{14}C -leucina se manteve inalterada na maioria dos tecidos em ambos os tempos de estresse hipóxico, indicando que a estratégia de supressão da síntese de proteínas, para diminuir o consumo de ATP, não foi utilizada pelo caranguejo. A redução na atividade da Na^+/K^+ -ATPase seria a principal estratégia analisada para diminuir o gasto energético durante a hipóxia por 1h.

O aumento na incorporação de ^{14}C -leucina em proteína observado em todos os tecidos estudados às 24h de reoxigenação após 8h em hipóxia sugere a reposição proteica após estresse hipóxico prolongado.

Os resultados sugerem a possível relação do HIF-1 α com a resposta à hipóxia e à reoxigenação em *N. granulata*. A diminuição na expressão de HIF-1 α no músculo, durante a hipóxia de 1h e a recuperação pós-hipóxia, pode ser interpretada como uma resposta ao aumento da concentração da proteína HIF-1 α celular. Estes resultados sugerem o envolvimento deste fator na resposta ao estresse em *N. granulata* como ocorre em vertebrados e outros crustáceos. No hepatopâncreas, no período de reoxigenação de 24h, o aumento nos níveis de mRNA de HIF-1 α sugere

a participação deste gene no controle do metabolismo da glicose no hepatopâncreas de *N. granulata*.

Em ambos os tempos de estresse hipóxico, a manutenção de níveis basais de formação de CO₂ a partir de ¹⁴C-piruvato, associada ao aumento da glicemia indicam que a mobilização de glicose nos tecidos excede sua utilização pela via glicolítica, causando seu acúmulo na hemolinfa. E, assim como a glicemia, a concentração de lactato hemolinfático também se eleva, demonstrando que o metabolismo anaeróbio é intensamente utilizado pelo caranguejo durante esse período.

Durante a fase de recuperação pós-hipóxia, embora os níveis de glicose e de lactato na hemolinfa diminuam gradativamente, a redução na oxidação de piruvato a CO₂ nos tecidos estudados dos animais submetidos à 8h de hipóxia indica que a oxidação destes substratos não é a via utilizada para metabolizar a glicose e/ou lactato produzidos durante o estresse. Por outro lado, o aumento da produção de CO₂ nas brânquias anteriores após 24h de recuperação pós-hipóxia de 1h sugere uma participação mais tardia desse tecido na metabolização desses substratos.

Portanto, a partir do exposto, pode-se concluir que as estratégias utilizadas pelo caranguejo *N. granulata* para reorganizar as prioridades do uso de energia são dependentes do tempo de exposição ao estresse hipóxico e essas respostas são tecido-específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRRIESS, C.N.; McMAHON, B.R. Cardiovascular adaptations enhance tolerance of environmental hypoxia in the crab *Cancer magister*. **J. Exp. Biol.** 190: 23-41, 1994.

ANDERSON, S. J.; TAYLOR, A. C.; ATKINSON, J. A. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). **Comp. Biochem. Physiol.**, 108 (4): 515-522, 1994.

BARDOS, J.I.; ASHCROFT, M. Negative and positive regulation of HIF-1: a complex network. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1755: 107-120, 2005.

BARNES, H.; BLACKSTOCK, J. Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 12: 103-118, 1993.

BEIS, I.; NEWSHOLME, E.A. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, 152: 23-32, 1975.

BERNASCONI, C.J.; UGLOW, R.F. Effects of emersion-induced hypoxia on some haemolymph constituents of *Nephrops norvegicus*. **Diseases of Aquatic Organisms**. 82: 135-143, 2008.

BIANCHINI, A.; LAUER, M.M.; NERY, L.E.M.; COLARES, E.P.; MONSERRAT, J.M.; SANTOS, E.A. (2008). Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. **Comp. Biochem. Physiol.** A. 151: 423-436, 2008.

BOND-BUCKUP, G.; FONTOURA, N. F.; MARRONI, N. P.; KUCHARSKI, L. C. R. **O Caranguejo**: Manual para ensino prático em zoologia. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1991.

- BOSCHI, E.E. Los crustáceos decápodos Brachyura Del litoral bonaerense (R. Argentina). **Bol. Inst. Biol. Mar.**, Mar Del Plata (Argentina). 6: 1-99, 1964.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of quantities of protein utilizing of principle protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, V. 72: 248-254, 1976.
- BROWN-PETERSON, N.J.; LARKIN, P.; DENSLOW, N.; KING, C.; MANNING, C.; BROUWER, M. Molecular indicators of hypoxia in the blue crab *Callinectes sapidus*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 286: 203-215, 2005.
- BROUWER, M.; BROWN-PETERSON, N.J.; LARKIN, P.; PATEL, V.; DENSLOW, N.; MANNING, S.; BROUWER, T.H. Molecular and whole animal responses of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, exposed to chronic hypoxia. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 341: 16-31, 2007.
- BUCK, L. ; HOCHACHKA, P.W. Anoxic suppression of Na⁺-K⁺-ATPase and constant membrane potencial in hepatocytes : suport for channel arrest. **Am. J. Physiol.** 265: R1020-R1025, 1993.
- BURNETT, K.; TERWILLIGER, N.; VAN DEN THILLART, G. Introduction: Genetic and phenotypic responses to hypoxia. *In: Genetic and phenotypic responses to hypoxia in the individual.* **Comp. Biochem. Physiol. A** 148: S95-S98, 2007.
- CASTILHO, P.C.; MARTINS, I.A.; BIANCHINI, A. Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 256: 215-227.
- CHAN, L.P.; SWAMINATHAN, R. Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination. **Clin. Chem.** 32, 1986.
- CHANG, E.; O'CONNOR, J.D. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. *In: Bliss, D.E. (ed). The Biology of Crustacea.* **Academic Press, New York.** P. 263-289, 1983.

CHILDRESS, J.J.; SEIDEL, B.A. Life and stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. **J. Exp. Biol.** 201: 1223-1232, 1998.

COHEN, H.T.; McGOVERN, F.J. Renal-Cell Carcinoma. **N. Engl. J. Med.** 353(23): 2477-2490, 2005.

COOPER, A.W. Salt marshes In: Odum, H.T.; Copeland, B.J. and Macmahon, E.A. (eds), Coastal Ecological Systems of United States. **The Conservation Foundation**, Washinton D.C. V. II, P. 55-98, 1974.

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

DA SILVA-CASTIGLIONI, D. Adaptações metabólicas de *Parastacus defossus* Faxon, 1898 e *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Tese de Doutorado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil, 2010.

DA SILVA-CASTIGLIONI, D.; OLIVEIRA, G.T.; BUCKUP, L. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol. A.** 156: 436-444, 2010.

DAWSON, N.J.; STOREY, K.B. An enzymatic bridge between carbohydrate and amino acid metabolism: regulation of glutamate dehydrogenase by reversible phosphorylation in a severe hypoxia-tolerant crayfish. **J. Comp. Physiol. B.** 182(3): 331-340, 2012.

DE OLIVEIRA, K.; ROTTA, L.N.; VALLE, S.C.; PILGER, D.A.; NOGUEIRA, C.W.; FEOLI, A.M.; BERNARD, E.A.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.S. Ontogenetic study of the effects of energetic nutrientes on amino acid metabolism of rat cerebral cortex. **Neurochem Res.** 27: 513-518, 2002.

DE OLIVEIRA, U.O.; ARAÚJO, A.S.R.; BELLÓ-KLEIN, A.; DA SILVA, R.S.M.; KUCHARSKI, L.C. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 140: 51-57, 2005.

DRACH, F.; TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la method de determination dês estates d' intermuda et son application generale aux crustsces. **Vie Milleu**, 161: 595-607, 1967.

ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺/K⁺-ATPase: molar and specific activity, protein determination. **Meth. Enzimol.** 156: 105-115, 1988.

FELDER, D.L. Respiratory adaptations of the estuarine mud shrimp *Calianassa jamaicense* (Schmitt, 1935) (Crustacea, Decapoda, Tallassinidea). **Buol. Bull.** 157: 125-137, 1979.

FERREIRA, T.C. Clonagem e expressão do fator 1 humano induzível por hipóxia (HIF-1) na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. DF, Brasil, Brasília: **UNB**. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Biologia Molecular) 2006.

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

GÄDE, G. Energy metabolismo f arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. **J. Exp. Zool.** 228: 415-429, 1983.

GÄDE, G. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolismo of the crayfish, *Orconectes limosus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 77: 495-502, 1984.

GEIHS, M.A.; MACIEL, F.E.; VARGAS, M.A.; CRUZ, BP; NERY, L.E.M. Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 445: 69-78, 2013.

GENOVESE, G.; LUQUET, C.M.; PAZ, D.A.; ROSA, G.A.; PELLERANO, G.N. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialised cells. **J. Anat.** 197: 239-246, 2000.

GONÇALVES, A. A. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (Crustácea: Decapoda: Grapsidae) durante a anoxia ambiental. Rio Grande: **FURG**, Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica), 1993.

GORR, T.A.; WICHMANN, D.; HU, J.; HERMES-LIMA, M.; WELKER, A.F.; TERWILLIGER, N.; WREN, J.F.; VINEY, M.; MORRIS, S.; NILSSON, G.E.; DETEN, A.; SOLIZ, J.; GASSMANN, M. Hypoxia tolerance in animals: biology and application. **Physiol. Biochem. Zool.** 83: 733-742, 2010.

HÄGG, M.; STEFAN, W. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. **Exp. Cell. Res.** 306: 180-191, 2005.

HARDY, K.M.; FOLLETT, C.R.; BURNETT, L.E.; LEMA, S.C. Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue- and muscle fiber type-dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. **Comp. Biochem. Physiol. A.** 163: 137-146, 2012.

HARRIS, A.L. Hypoxia – a key regulatory factor in tumour growth. **Nat. Rev. Cancer.** 2(1): 38-47, 2002.

HARTNOLL, R. G. Evolution, Systematics and Geographical Distribution. In: Burggren, W. and McMahon, B. (eds.) Biology of Land Crabs. **Cambridge University Press**, New York. P. 6-54, 1988.

HEAD, J.M. Effects of hypoxia on hemocyanin regulation in *Cancer magister*. Possible role of Hypoxia-Inducible Factor-1. **J Exp Mar Biol Ecol** 386: 77-85, 2010.

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

HERMES-LIMA, M.; ZANTENO-SAVÍN, T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. **Comp. Biochem. Physiol. C.** 133: 537-556, 2002.

HERVANT, F.; MATHIEU, J.; GARIN, D.; FREMINET, A. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigeal *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). **Physiol Zool** 68: 223-244, 1995.

HERVANT, F.; MATHIEU, J.; BARRÉ, H. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipods to long-term starvation and subsequent refeeding. **J. Exp. Biol.** 202: 3587-3595, 1999.

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

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. Biochemical Adaptation. **Princeton University Press**, New Jersey. 538pp, 1984.

HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P.L. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comp. Biochem. Physiol. B** 130: 435-459, 2001.

ISANI, G.; CATTANI, O.; CARPENE, E.; TACCONI, S.; CORTESI, P. Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequivalis* (Bruguieri). **Comp. Biochem. Physiol. B.** 93: 193-200, 1989.

IVAN, M.; KONDO, K.; YANG, H.; KIM, W.; VALIANDO, J.; OHH, M.; SALIC, A.; ASARA, J.M.; LANE, W.S.; KAELIN, W.G. Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. **Science**. 292: 464-468, 2001.

JAAKKOLA, P.; MOLE, D.R.; TIAN, Y.M.; WILSON, M.I.; GIELBERT, J.; GASKELL, S.J.; KRIEGSHEIM, A.; HEBESTREIT, H.F.; MUKHERJI, M.; SCHOFIELD, C.J.; MAXWELL, P.H.; PUGH, C.W.; RATCLIFFE, P.J. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. **Science**. 292: 468-472, 2001.

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

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. A**. 100: 599-602, 1991.

LEWIS, J.M., COSTA, I; VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F.; GAMPERL, A.K., DRIEDZIE, W.R. Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. **J. Exp. Biol.**, 210: 1935-1943, 2007.

LI, T.; BROUWER, M. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaeomonetes pugio*: molecular characterization and response to hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol. B**. 147: 11-19, 2007.

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

LUQUET, C.M.; GENOVESE, G.; ROSA, G.A.; PELLERANO, G.N. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. **Mar. Biol.** 141: 753-760, 2002.

LUTZ, P.L.; NILSSON, G.E. Contrasting strategies for anoxic brain survival-glycolysis up or down. **J. Exp. Biol.** 200: 411-419, 1997.

LUTZ, P.L.; STOREY, K.B. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: Danzler, W.H. (Ed.), Handbook of Physiology. Section 13. Comp. Physiol., vol. II. American Physiological Society, Bethesda, NY, PP. 1479-1522.

MACIEL, J.E.S. Efeito da composição da dieta sobre o metabolismo do lactato no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido a hipóxia e a recuperação da hipóxia. RS, Brasil, Porto Alegre. **Tese de Doutorado**, UFRGS (Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia) 2007.

MACIEL, J.E.S.; SOUZA, F.; VALLE, S.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. **Comp. Biochem. Physiol.**, 151A: 61-65, 2008.

MAHON, P.C.; HIROTA, K.; SEMENZA, G.L. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. **Genes Dev.** 15: 2675-2686, 2001.

MAÑE-GAZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B. H.; LEYMONTE, J. Estudios sobre la biología Del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851. I. Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. **Physis, Seccion A**, 33 (86): 163-171, 1974.

MARQUEZE A.; KUCHARSKI L.C.; DA SILVA R.M.S. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chas-*

magnathus granulatus maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. **J Exp Mar Biol Ecol** 332: 198-205, 2006.

MARQUEZE A.; RIBARCKI, F. P.; KIRST, I; KUCHARSKI L.C.; DA SILVA R.M.S. Glucose metabolism in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets: anoxia and recovery. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 404: 40-46, 2011.

McMAHON, B.R. Respiratory and circulatory compensation to hypoxia in crustacean. **Resp. Physiol.** 128: 349-364, 2001.

MENTE, E.; CARTER, C.G.; BARNES, R.S.K.; KARAPANAGIOTIDIS I.T. Protein synthesis in wild-caught Norway lobster (*Nephrops norvegicus* L.). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 409: 208-214, 2011.

MORRIS, S.; ADAMCZEWSKA, A. Utilization of glycogen, ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. **Comp Biochem Physiol** 133 A: 813-825, 2002.

NILSSON, G.E. Surviving anoxia with the brain turned on. **News Physiol. Sci.** 16: 217-221, 2001.

ODUM, E. P. **Ecologia Interamericana** (ed), Rio de Janeiro, 435p. 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.** 118 A, 1429-1435, 1997.

OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. Hepatopancreas gluconeogenesis during hypotonic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127(3): 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. **Marine Biology** 139, n.2, p.335 – 342, 2001.

OLIVEIRA, G. T.; EICHLER, P.; ROSSI, I. C.; DA SILVA, R. S. M. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high protein or carbohydrate rich diets. **J Exp Zool A** 301: 240-289, 2004.

PELLEGRINO, R.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 358: 144-150, 2008.

POELLINGER, L.; JOHNSON, S.R. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 14: 81-85, 2004.

RAMNANAN, C.J.; STOREY, K.B. Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lacteal*. **J. Exp. Biol.** 209: 677-688, 2006.

REIBER, C.L.; McMAHON, B. Progressive hypoxia effects on the crustacean cardiovascular system: a comparison of the freshwater crayfish *Procambarus clarkia* and the lobster *Homarus americanus*. **J. Comp. Physiol. B.** 168: 168-176, 1998.

RICHARDSON N.A., ANDERSON A.J., SARA V.R. The effects of insulin/IGF-1 on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. **Gen Comp Endocrinol** 105: 287-293, 1997.

ROSSETTI, C.L. Determinação da glicemia e das reservas de glicogênio e de fosfogênio em tecidos de caranguejos *Neohelice granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos à anoxia e à fase de recuperação da anoxia. **Trabalho de Conclusão de Curso**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil, 2010.

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 granulatus* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.*, 88A (1): 21-25, 1987.

SEMENZA, G. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends in Molecular Medicine**. 7(8): 345-350, 2001.

SEMENZA, J. Targeting HIF 1 for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer** : 721-732, 2003.

SCHEIN, V. (1999). Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Dissertação de Mestrado**, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

SCHMITT, A.S.C.; UGLOW, R.F. Metabolic responses of *Nephrops norvegicus* to progressive hypoxia. **Aquatic Living Resources**. 11(2): 87-92, 1998.

SOÑANEZ-ORGANIS, J.G.; PEREGRINO-URIARTE, A.B.; GÓMEZ-JIMÉNEZ, S.; LÓPEZ-ZAVALA, A.; FORMAN, H.J.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue specific expression under hypoxia. **Comp. Biochem. Physiol. C**. 150: 395-405, 2009.

SOÑANEZ-ORGANIS, J.G.; RACOTTA, I.S.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Silencing of the hypoxia inducible factor 1 –HIF-1– obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 393: 51-58, 2010.

SOUZA, S.K.; MARTINS, T.L.; FERREIRA, G.D.; VINAGRE, A.S.; DA SILVA, R.S.M.; FRIZZO, M.E. Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral cortex. **Metabolic Brain Disease**. 28: 25-32, 2013.

STAPLES, J.F.; BUCK, L.T. Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. **Comp. Biochem. Physiol. A.** 153: 95-105, 2009.

STOCKMANN, C.; FANDREY, J. Hypoxia-induced erythropoietin production: a paradigm for oxygen-regulated gene expression. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 33(10): 968-979, 2006.

STOLZE, I.P.; TIAN, Y.M.; APPELHOFF, R.J.; TURLEY, H.; WYKOFF, C.C.; GLEADLE, J.M.; RATCLIFFE, P.J. Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes. **J. Biol. Chem.** 279(41): 42719-42725, 2004.

STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation, and estivation. **Q. Rev. Biol.** 65: 145-174, 1990.

STOREY, K.B.; STOREY, J.M. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. **Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.** 79: 207-233, 2004.

STOREY, K.; STOREY, J.M. Tribute to P. L. Lutz: putting life on “pause” – molecular regulation of hypometabolism. **J. Exp. Biol.** 210: 1700-1714, 2007.

TAYLOR, H.H.; ANSTISS, J.M. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. **Mar. Freshw. Res.** 48: 889-897, 1999.

TURCATO, G. S. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na lagoa de Tramandaí, RS, Brasil, Porto Alegre: **UFRGS**. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em zoologia) 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.** 91 A, 299-304, 1988.

VINAGRE, A.P.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.** 102A: 579-583, 1992.

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

WACHTER, B. D.; SARTORIS, F. J.; PÖRTNER, H. O. The anaerobic endproduct lactate has behavioural and metabolic signalling function in the shore crab *Carcinus maenas*. **J Exp Biol** 200: 1015-1024, 1997.

WANG, G.L.; JIANG, B-H., RUE, E.A.; SEMENZA, G.L. Hypoxia-inducible factor is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 92: 5510-5514, 1995.

WEIHRAUCH, D.; WILKIE, M.P.; WALSH, P.J. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. **J. Exp. Biol.** 212: 1716-1730, 2009.

WHEATON, W.W.; CHANDEL, N.S. Hypoxia regulates cellular metabolism. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** 300: C385-C393, 2011.

WILKENS, J.L.; McMAHON, B.R. Aspects of branchial irrigation in the lobster *Homarus americanus* L. **J. Exp. Biol.** 56: 469-479, 1972.

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

ZOU, E.; DU, N.; LAI, W. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of Chinese freshwater crab *Erioccheir sinenses* (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.** 114A: 105-109, 1997.

ARTIGO CIENTÍFICO

Energetic metabolism in jaw muscle and hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata* submitted to hypoxia and post-hypoxia recovery

Artigo submetido ao periódico: Marine Biology

Energetic metabolism in jaw muscle and hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata* submitted to hypoxia and post-hypoxia recovery

Tiago L. Martins¹, Ricardo Pellegrino¹, Samir K. Souza¹, Aline Gonçalves¹, Anapaula S. Vinagre¹, Márcia Trapp¹, Vanessa Schein²; Luiz Carlos Kucharski¹, Roselis S.M. Da Silva^{1*}

¹Department of Physiology, ²Department of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

MSc. Tiago Leal Martins

Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Fax +55 51 33 08 3453

e-mail: tlmpoa@uol.com.br

Abstract

Little is known about the strategies to reduce the ATP consumption and the reorganization of the priorities for energy use in *Neohelice granulata* exposed to hypoxia (1h or 8h) and reoxygenation (3h or 24h). The aim of this study was to know the metabolic and molecular strategies used by hepatopancreas and jaw muscle of the crab *N. granulata* in response to exposure to low environment O₂ levels and different periods of reoxygenation. *N. granulata* could be classified as a conformer oxygen, when hypoxia occurs for a short period (1h). In muscle crab reduce the ATP expenditure decreasing the Na⁺/K⁺-ATPase activity. However, in hepatopancreas the Na⁺/K⁺-ATPase activity is maintained. In 8h of hypoxia with higher glucose and lactate levels, the activity of Na⁺/K⁺-ATPase enzyme returns the values similar to those of normoxia, however, the animal has energy substrates to face the reduction of oxygen in the environment. On reoxygenation, the metabolic strategies for the restoration of energy reserves and the removal of accumulated end products vary according to the times of hypoxic stress and reoxygenation and also are tissue specific. For the first time in *N. granulata* is shown the involvement of HIF-1α in response to hypoxic stress and its possible role in the mobilization of energy substrates, particularly in muscle and hepatopancreas.

Key words: crustacean; hypoxia; post-hypoxia recovery; energetic metabolism, HIF-1; muscle, hepatopancreas

1. Introduction

Hypoxia and anoxia are one of the major causes of damage to tissues, anoxia and hypoxia tolerant organisms have become important models to understand protective mechanisms which prevent cellular damage during the absence of oxygen (Lutz and Storey 1997; Hochachka and Lutz 2001; Gorr et al. 2010). *Neohelice granulata* is a crab found in the estuaries in Brazil coast where it constructs galleries or burrows with depths varying according to the level of the tides and groundwater, so that there is always water in the bottom of the burrow. These habitations have an important role in the ecophysiology of *N. granulata*, because they minimize variations in salinity, temperature and dissolved oxygen of the water (Turcato 1990). In its habitat the *N. granulata* undergo prolonged periods of hypoxia or anoxia, because the concentration of dissolved oxygen in the water can vary from 2.80 mg O₂/L to 11.78 mg O₂/L, and in winter can reach near zero when the animal closes its burrow (Turcato 1990). To survive, this crab switches to anaerobic metabolism to produce ATP from glycolysis in hepatopancreas and muscle (Marqueze et al. 2006, 2011; Maciel et al. 2008; Geihs et al. 2013). After 1h of anoxia, the activation of glycolytic pathway in hepatopancreas and muscle was followed by a reduction in glycogen values, and increase in the hemolymphatic lactate and glucose levels (Marqueze et al. 2006, 2011). This metabolic pattern is found in turtles, goldfish, marine mollusks, and crayfish where the initial response to transition from normoxia to hypoxia is an activation of glycolysis, followed by a strong depression of glycolytic flux as true anoxia is reached (Storey and Storey 1990; Dawson and Storey 2012). Moreover, the anoxia exposure (4h) led to a reduction in glucose uptake and glycogen synthesis in *N. granulata* hepatopancreas accompanied by increase in the glycogen mobilization and glycogen phosphorylase activity (Oliveira et al. 2001). Recently, Geihs et al. (2013) found a decrease in oxygen consumption and locomotor activity in *N. granulata* after 1, 4 and 10 hours of hypoxia stress.

In insects, fishes, reptiles, birds and mammals a key regulator in tolerating hypoxia is the transcription factor hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), probably, one of the main responsible factors for coordinating anaerobic glycolysis (Hochachka and Lutz 2001; Gorr et al. 2010). HIF-1 has basic helix–loop–helix (bHLH)/PAS (Per/ARNT/Sim) domains and it is formed by two subunits; α (HIF-1 α) and β (HIF-1 β also known as the arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT). The HIF-1 α and HIF-1 β subunits are constitutively expressed, but HIF-1 α is posttranslationally regulated in response to oxygen levels (Semenza et al. 1991, 1994; Wang et al. 1995; Soñanez-Organis et al. 2010). Little is known about the role of HIF in the metabolic response to hypoxia in crustaceans. However, activation of HIF expression in response to hypoxia may be one the main strategies to defender the cell's

transition aerobic to anaerobic state in crustaceans and enable these animals to adapt to environments with large variation of oxygen in the water.

In the shrimp *Litopenaeus vannamei* the silencing of the α and β subunits transcripts of HIF-1 gene affected the concentrations of glucose and lactate in hemolymph and gills after exposition to hypoxia conditions (Soñanez-Organis et al. 2010). Recently, Hardy et al. (2012) suggest that in *Callinectes sapidus* tissues HIF- α and ARNT/HIF- β mRNAs were constitutively present in normoxia. However, the hypoxia exposure resulted in both tissue-specific and muscle fiber type-specific effects on relative HIF- α mRNA levels under hypoxia condition.

The process of post-hypoxia recovery is of great functional importance, because it is during recovery that energy reserves are restored and the accumulated end products are removed from the organisms. However, return of oxygen to normoxic may induce to oxidative damages. De Oliveira et al. (2005) show that *N. granulata* submitted to anoxia and different periods of reoxygenation present strategies of preparation for oxidative stress as observed in other intertidal species (Lutz and Storey 1997; Hochachka and Lutz 2001; Gorr et al. 2010), enabling this crab to survive in an environment with variations in chemical and physical parameters.

The metabolic pattern of 3h of post-anoxia or hypoxia recovery in *N. granulata* shows an increase in glucose oxidation and gluconeogenesis from lactate in muscle, and glycogen synthesis and concentration in hepatopancreas (Marqueze et al. 2006, 2011; Maciel et al. 2008). Moreover, after 24h of post-anoxia recovery the glycogen synthesis and the glycogen synthase I remain high in the hepatopancreas (Oliveira et al. 2001).

According several authors the most important biochemical adaptations that contribute to survival in anaerobiosis include anaerobic production of the ATP, reduction in ATP consuming pathways and reorganization of the priorities for energy use (Ramnanan and Storey 2005; Storey and Storey 2004). The maintenance of the transmembrane potential, established by ion pumping, is essential for cell viability, for this reason, in anoxic conditions 74% of the total flow of ATP in the cell is directed to the Na^+/K^+ -ATPase, compared to 28% found in normoxia (Buck and Hochachka 1993). Recently, Geihs et al. (2013) after submitted the crab *N. granulata* to hypoxia for 1, 4 and 10 hours found that the activity of the mitochondrial respiratory chain complex in locomotor muscle decrease only after 10 h in hypoxia. This result suggests that in the early (1h and 4h) of hypoxia the locomotor muscle did not present metabolic depression (Geihs et al. 2013).

Another way to reduce energy demand during hypometabolism is the suppression of protein synthesis (Storey and Storey 2007). This process accounts for about 18-26% of the cellular energy expenditure and its reduction is a major contributor to restrict the consumption of ATP (Lewis et al. 2007). However, as observed in fish *Astronotus ocellatus*

subjected to acute hypoxia, there is a tissue-specific difference in the magnitude of the depression in protein synthesis induced by hypoxia (20% brain, other tissues 50-60%), suggesting that the brain function during hypoxia are maintained to facilitate the behavior of leakage in response to predation (Lewis et al. 2007).

N. granulata crabs count on behavioral, physiological and biochemical strategies to withstand episodes of seasonal, circadian and tidal hypoxia and reoxygenation common characteristic in the estuaries aquatic environment. However, little is known about the strategies to reduce the ATP consumption and the reorganization of the priorities for energy use in *N. granulata* exposed to different times of hypoxia and reoxygenation. Therefore, the aim of this study was to know the metabolic and molecular strategies used by hepatopancreas and jaw muscle of the crab *Neohelice granulata* in response to exposure to low environment O₂ levels and different periods of reoxygenation.

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male crabs *Neohelice granulata* in stage C of the intermolt cycle (Drach and Tchernigovtzeff 1967), were collected in Lagoa Tramandaí, a lagoon in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (29°58'S, 50°08'W) in late spring and summer. The animals were collected according to Brazilian environmental laws. All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Experimental Procedures

Before they were used in the hypoxic challenge experiments, the animals were maintained for 10 days in aerated aquaria (155 Torr dissolved O₂ in the water), salinity of 20‰, temperature 25°C and under a natural light-dark cycle, where they were provided with the experimental diet of raw beef.

After the acclimation period, the animals were divided into two experimental groups and subjected to 1h or 8h of hypoxic stress in 20L aquaria sealed, with 38 Torr O₂. The reduction in oxygen level was obtained by aerating the water with nitrogen gas and monitoring with an oximeter (World Precision Instruments model Oxel-1/ISO₂). Next, a part of these animals was used for the experiments (hypoxia group) and the other crabs were returned to water containing 155 Torr O₂ where they remained for 3h or 24h (recovery group). The control group was maintained in normoxia during the entire experimental period.

The tissues were obtained from crabs anesthetized by chilling on ice for 5 min, and jaw muscle and hepatopancreas samples (50-100 mg) were immediately removed and

placed in a Petri dish containing cool incubation buffer adapted to *N. granulata* (SFC): 300mM NaCl, 10mM KCl, 25mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, 8.8mM H₃BO₃, plus 10mM HEPES and 0.1mM phenylmethsulphonyl fluoride (PMSF), pH 7.8. The hemolymph of these animals was collected from the joints of the 4th and 5th pereopods, using 10% potassium oxalate as an anticoagulant, and used for the biochemical determination of glucose and lactate.

2.3. Determination of the Conversion of ¹⁴C-leucine to ¹⁴C-proteins

For determination of ¹⁴C-protein synthesis, fraction of the tissues (about 50mg) were incubated at 25°C with constant shaking in 500µl of SFC, equilibrated with O₂:CO₂ (95:5, v/v) in the presence of 0.2µCi of [U-¹⁴C]-leucine (315mCi/mmol Amersham, International), plus 5mM of unlabeled leucine, for 180min. Previous trials showed that incorporation rates remained linear over the incubation period (Vinagre and Da Silva 2002). Following incubation, the tissue fractions were removed from the medium, rinsed twice in cold incubation buffer (without radiolabeled products), blotted on filter paper, and immediately transferred to screw cap tubes containing 500µl of distilled water and were homogenized by polytron at 20,000rpm for 30s. Samples (50µl) were removed for determination of total proteins (Bradford, 1976). A 200µl volume of homogenate was then applied to 2.5 x 2.5 cm of 3MM Whatman papers and allowed to dry. To precipitate proteins filter papers were rinsed in 10% TCA for 10min. Strips were then washed twice with 95% ethanol and twice in ether (Richardson et al. 1997). After drying, filter papers were inserted into 5mL scintillation liquid and counted in a β liquid scintillation spectrometer (LKB-Wallac). The results were expressed as µmol of ¹⁴C-leucine converted into ¹⁴C-protein.mg⁻¹ of protein.h⁻¹ of incubation.

2.4. ¹⁴CO₂ formation

Pyruvate oxidation was determined according to Torres et al. (2001). Hepatopancreas and jaw muscle samples (50 ± 2 mg) were incubated in flasks sealed with rubber caps at 25°C in 1 mL of incubation buffer in the presence of 0.2 µCi [1-¹⁴C] pyruvic acid (18 mCi mmol, Perkin Elmer) plus 5 mM pyruvic acid for 60 min, in accordance with Marqueze et al. (2006). Saturating pyruvate concentrations were used for CO₂ production.

In these flasks, small glass wells situated above the level of the incubation medium contained small strips of Whatman 3MM paper. Next, 1 M hyamine hydroxide (Ammonium, benzyldimethyl(2-(2-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) tolyloxy) ethoxy) ethyl)-chloride) solution in methanol was injected (0.2 mL) into the central wells to trap ¹⁴CO₂. Incubation was stopped by adding 0.2 mL of 50% TCA through the rubber cap. The flasks were shaken for a further 60 min at 25°C to trap ¹⁴CO₂. The contents of the center well were transferred to vials with scintillation liquid and the radioactivity was counted using LKB counter. Values of

$^{14}\text{CO}_2$ production are expressed as nmol of ^{14}C pyruvate incorporated into $^{14}\text{CO}_2$ per mg^{-1} of tissue. min^{-1} .

2.5. Determination of ATP Content

Upon completion of the experimental periods, the animals were anesthetized by chilling on ice for 5 min and tissues (about 100mg) were sampled and immediately frozen in liquid nitrogen. The tissues were homogenized with lysis buffer (TCA 6%, NaF 20mM, Gelatin 0.4g.L⁻¹) and the concentration of ATP was determined through the bioluminescent luciferin technique using the Invitrogen kit (A22066). Results were expressed as μmol of ATP. mg^{-1} of tissue.

2.6. Enzyme Assays

For determination of Na^+/K^+ -ATPase (EC 3.6.1.3) activity, the membrane was extracted from tissue (500mg) according to Barnes and Blackstock (1993). The tissue was homogenized (10% w/v) in cold Tris buffer (40mM) and 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 10,000xg at 4°C, and the supernatant was collected and centrifuged at 40,000xg (4°C). The pellet was resuspended in the same buffer and centrifuged again at 40,000xg (4°C). This last supernatant was then used as the source of Na^+/K^+ -ATPase. A sample was removed for measure of proteins. Na^+/K^+ -ATPase activity was determined according to the method described by Esmann (1988). Incubation (500 μl) medium A contained ATP (5mM, Sigma), NaCl_2 (60mM), KCl (10mM) and MgCl_2 (40mM), pH 7.4. In incubation (500 μl) medium B, KCl was replaced by ouabain (1mM, Sigma). Aliquots (50mg of protein) of homogenate were incubated at 30°C in medium A or B, for 30min. The enzyme reaction was stopped by addition of 10% trichloroacetic acid. The inorganic phosphate (Pi) released from ATP hydrolysis was determined using the method of Chan and Swaminathan (1986) and Na^+/K^+ -ATPase activity was calculated as difference between medium A and B in Pi content in nmol per min. Results were expressed in nmol of the Pi. mg^{-1} of protein. min^{-1} .

2.7. HIF-1 α Gene Expression

Analysis of hypoxia inducible factor-1 α gene expression was carried out by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) using the following primers: HIF-1 α (5' TTCCTTCGCCTCAAGTGAC-3' / 3'-GCTCACGAAGGTCTGCTTGTC-5') and 18S (5'-GGAAGTATGGTTGCAAAGCTG-3' / 3'-TCTCAATCTGTCAATCCTTCCG-5').

Those specific primers were designed using the IDT Design Software (Integrated DNA Technologies Inc., USA) and were based on the conserved genetic sequence regions after a multiple alignment performed with Clustal X, since the partial HIF-1 α and 18S sequences of *Neohelice granulata* was not yet available in GenBank. The sequences included have the following GenBank accession numbers: HIF-1 α : *Callinectes sapidus*, JN673810; *Cancer magister*, DQ535030; *Litopenaeus vannamei*, FJ807918; *Palaemonetes pugio*, AY655698; *Oratosquilla oratoria*, HM32914. GenBank accession numbers for 18S are: *C. sapidus*, M34360; *L. vannamei*, EU920969; *Danio rerio*, FJ915075.

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen) individually from crab tissues (muscle and hepatopancreas). RNA integrity was confirmed by 1% agarose-TBE gel electrophoresis. The cDNA was synthesized from total RNA (2 μ g) by reverse transcription (RT) with First Strand cDNA Synthesis kit (Invitrogen). HIF-1 α expression levels were compared to the 18S as an internal standard. The qRT-PCR was performed on the Step One PlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems) in a reaction solution containing: 2 μ L Buffer (10x); 1.2 μ L MgCl₂ (50mM); 0.2 μ L DNTPs (10mM); 2 μ L Sybr Green (100x); 0.8 μ L (0.1 μ M) of 18S primer and 1.6 μ L (0.2 μ M) of HIF-1 α primer; 0.05 μ L Taq Platinum (5UN/ μ L); 1 μ L of cDNA (1:10); and H₂O to complete a final volume of 20 μ L per well in a MicroAmp Fast Optical Reaction plate (Applied Biosystems). After denaturing at 94 °C for 5 min, amplifications were performed for 40 cycles at 94 °C for 15 s, 58 °C for 30 s. After amplification, the reaction product was subjected to melting phase, where the temperature ranged from 58 °C to 99 °C and the fluorescence was acquired every 0.4 °C. Negative controls were included. For each measurement, expression levels were normalized to 18S and expressed as relative values (HIF-1 α /18S). The values for the normoxia group were normalized to 1. The data were analysed using Step One Software version 2.0.

2.7. Biochemical Determinations

The concentration of lactate in the hemolymph was determined by Katal Brasil kit. The results were expressed in mmol lactate per liter.

The glucose concentration was determined by the enzymatic oxidase method (Labtest Enz-color kit). The results were expressed in mmol glucose per liter.

The protein concentration was determined according to the method of Bradford (1976), using bovine albumin as the standard.

2.8. Statistical Analysis

The results were expressed as the mean plus the standard deviation (mean \pm SD) or standard error (mean \pm SE). Results were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA), complemented with a Student-Newman-Keuls (SNK) test, after confirmation of homogeneity and normality of the data. The data were considered significant when $p < 0.05$ and the tests were carried out with the statistics program SigmaStat 3.5.

3. Results

After 1 h and 8h hypoxia, hemolymph glucose concentrations increased, and reached levels 1.9 and 11 ($p < 0.05$) times higher than normoxia group levels, respectively. The hemolymph glucose concentration decreased ($p < 0.05$) after 3h of post-hypoxia recovery as compared to hypoxia and normoxia groups, and lead to concentration similar to that found in the normoxia group (Table 1).

The hemolymphatic lactate concentration increased 3 fold ($p < 0.05$) after 1-h hypoxia as compared to normoxia animals. However, after 8h hypoxia the lactate hemolymph levels increased 37 fold as compared to normoxia values. During the recovery from hypoxia, the lactate levels in the hemolymph decreased ($p < 0.05$) and reached to values 2 and 11 fold lower after 3 and 24h post-hypoxia recovery, respectively, when compared to the value observed in normoxia (Table 1).

The Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity in the muscle decreased ($p < 0.05$) after 1h hypoxia compared to that observed in the normoxia group. After 3 and 24 h in recovery, the values of Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity were similar to those observed in the hypoxia group, and significantly ($p < 0.05$) lower than those observed in the normoxia group. After 8 h in hypoxia the Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity was similar to that observed in the normoxia group (Fig. 1).

In the hepatopancreas of crabs exposed to 1h the hypoxia Na^+/K^+ -ATPase enzyme activity decreased 20% ($p < 0.05$) only at 24 h post-hypoxia recovery. In crabs submitted to 8h of hypoxia, no significant change in enzyme activity during hypoxic stress or during the recovery phase were observed (Fig. 1).

Crabs subjected to 1h of hypoxia stress, a linear decrease ($r^2 = 0.99$) in the concentration of ATP in the muscle was observed until 24 h of recovery from hypoxia. However, the mandibular muscles of animals exposed to hypoxia for 8 h there was no change in the concentration of ATP, even in times of reoxygenation studied (Fig. 3).

In the hepatopancreatic tissue of *N. granulata* exposed to hypoxic stress for 1 h and reoxygenation for 3 and 24 hours, no significant changes were observed in the concentration of ATP. However, after 8 hours of hypoxia the ATP levels in the hepatopancreas de-

creased by 75% ($p < 0.05$); during reoxygenation (3h and 24h) the ATP concentration increased ($p < 0.05$) to values similar to those of normoxia group (Fig. 3).

In the tissues of *N. granulata* studied, no significant changes were observed in the incorporation of ^{14}C -pyruvate into $^{14}\text{CO}_2$ during 1 and 8h of hypoxia stresses, when compared those observed in the normoxia group. However, in the tissues studied post-hypoxia recovery after 8h hypoxia decreased between 2 and 3 times ($p < 0.05$) the $^{14}\text{CO}_2$ production when compared to that observed in normoxia group (Fig. 4).

The hypoxia and 3 h recovery times did not affect significantly the protein synthesis capacity in the jaw muscle. However, an increase of about 54% ($p > 0.05$) in the incorporation of ^{14}C -leucine into proteins was observed in the jaw muscle at 24h of recovery after 8h hypoxia (Fig. 2).

When the crabs were submitted to hypoxia for 1 h no significant changes in the proteins synthesis in the hepatopancreas, however, after 3h recovery occurred a decrease ($p < 0.05$) in the ^{14}C -leucine incorporation into proteins which was maintained until 24h of reoxygenation (Fig. 2).

In the hepatopancreas the protein synthesis after 8h of hypoxia decreased about 63% ($p > 0.05$), and then a linear increase ($r^2 = 0.99$) during the post-hypoxic recovery was observed. After 24h reoxygenation these values were 2.5 times greater ($p < 0.05$) when compared to normoxia group (Fig. 2).

In normoxia, the expression of HIF-1 α in the jaw muscle was 2 to 2.5 fold greater ($p < 0.05$) compared to hepatopancreas. After 1h exposure of animals to hypoxia there was a decrease of 94% ($p < 0.05$) in gene expression of HIF-1 α in jaw muscle, which was maintained until 24h of reoxygenation (Fig. 5).

When the crabs were subjected to hypoxia for 1h no significant changes were observed in the expression of HIF-1 α in hepatopancreas, however, after 24 hours of reoxygenation there was a 4-fold increase ($p < 0.05$) in the expression of this gene (Fig. 5).

4. Discussion

Due to ecological and behavioral characteristics, the *N. granulata* crab is an excellent benthic organism for the knowledge of the physiological and biochemical mechanisms involved in strategies of tolerance to environmental hypoxia and reoxygenation. The *N. granulata* has a low tolerance to hypoxia compared that of other crustaceans, for example, the shrimps *Callinassa jamaicensis* and *Calocaris macandrea* (Geihs et al. 2013; Anderson et al., 1994; Felder, 1979). However, it has a capacity for rapid post-hypoxia recovery, probably due to rapid changes in concentration of dissolved oxygen in the water that occur daily in their habitat (Geihs et al. 2013).

Previous studies in *N. granulata* demonstrate increased in concentrations of lactate and glucose in the hemolymph, activation of the glycolytic and gluconeogenic pathways from lactate in muscle and hepatopancreas, the mobilization of glycogen and ATP tissues reserves are some of the strategies used to maintain energy production in response to reduced levels of oxygen in the environment (Geihs et al. 2013, Marquese et al. 2006, 2011, Maciel et al. 2008, Oliveira et al. 2004).

In animals that face different forms of stress in their habitats, reducing the ionic pumping significantly reduces energy expenditure (Staples and Buck 2009). The activity of the enzyme Na^+/K^+ -ATPase, one of the largest consumers of cellular ATP, reduces by about 75 % in hepatocytes turtles subjected to anoxia (Buck and Hochachka 1993). As the ion homeostasis is a priority function in the cell, 28% of ATP consumption in hepatocytes is directed to Na^+/K^+ -ATPase in conditions of normoxia. However, in anoxia, 74 % of the ATP produced in the cell are targeted to this enzyme, despite a reduction of 75 % of its activity (Buck and Hochachka 1993).

The use of behavioral, respiratory, circulatory and changes in the O_2 affinity of hemocyanin strategies have been described in crustaceans during hypoxia or anoxia environmental (Head 2010). Hervant et al. (1995) found a reduction of oxygen consumption and locomotor activity in amphipod *Niphargus rhenorhodanensis* exposed to severe hypoxia. The same effects were observed in *N. granulata* after environmental hypoxia (Santos et al. 1987, Geihs et al. 2013).

In the present study, exposure of crabs *N. granulata* to hypoxic stress for 1h shows that this crab also uses the reduction of Na^+/K^+ -ATPase activity as strategy to reduce energy expenditure in the jaw muscle. This effect persists even during subsequent reoxygenation periods. The decrease in energy expenditure from the reduction of enzyme activity is evidenced by the maintenance of ATP levels in muscle during hypoxia. Likewise, in the *Nautilus pompilius* which survives at least 60 h in hypoxia was not observed decrease in the concentration of ATP in the adductor muscle during the hypoxic stress (Staples and Buck 2009). Recently, Geihs et al. (2013) demonstrated that the *N. granulata* subjected to different times of hypoxia markedly reduces oxygen consumption (VO_2) and locomotor activity. However, the results of this work show that the capacity for protein synthesis and the ability of pyruvate oxidation were not altered by 1h of hypoxia in *N. granulata*, suggesting that in muscle the strategy used in the first hour of hypoxia is to reduce the energy expenditure via decreased activity of the pump Na^+/K^+ -ATPase and oxygen consumption (Geihs et al. 2013). This finding is reinforced by the fact that in the locomotor muscle of *N. granulata* subjected to different periods of hypoxia was not observed reduction in the mitochondrial respiratory chain complex (complex IV) activity after 10 hours of hypoxia (Geihs et al. 2013).

In contrast, in *N. granulata* hepatopancreas, hypoxia for 1 h did not reduce the activity of Na⁺/K⁺-ATPase and did not alter the concentration of ATP in this tissue. The difference in response between different tissues can be explained, in part, by the different metabolic pattern of the muscle and hepatopancreas. The hepatopancreas is an energy reserves tissue with high concentrations of glycogen and lipid that are stored during periods of food abundance as in spring and summer and during refeeding after fasting (Kucharki and Da Silva 1991, Vinagre and Da Silva 1992, 2002). On the other hand, the jaw muscle spends energy moving of jaw movement. Thus, the reduction of Na⁺/K⁺-ATPase enzyme activity in muscle would be a strategy for reducing the consumption of ATP in the body when the oxygen concentration in the environment are greatly reduced.

The preferential use of phosphagens reserves in order to maintain a high concentration of ATP has been observed in other crustaceans and molluscs (Gade 1983, Hervant et al. 1995, Isani et al. 1989, da Silva-Castiglioni et al. 2010) and could explain the maintenance of tissue ATP levels observed in this work after 1 h of environmental hypoxia. However, Rossetti (2010) after submitting the crab *N. granulata* to anoxic stress for 1 h observed an increase in reserves of arginine and arginine phosphate in the gills, jaw muscle and hepatopancreas.

Other studies with this species have shown that exposure of animals to hypoxia or anoxia increases the levels of glucose and lactate in the hemolymph (Maciel et al. 2008, Marqueze et al. 2011, Oliveira et al. 2001, Geihs et al. 2013). Previous studies show that after 1 h of anoxia the glycolytic pathway activity in jaw muscle and hepatopancreas of *N. granulata* fed a diet of raw beef increased. The activity of the enzyme pyruvate kinase (PK) is significantly high when compared to that observed in normoxia group (Marquese et al. 2006, 2011). In the present study, a significant increase in the hemolymphatic concentrations of glucose and lactate was observed after 1 h of hypoxia, suggesting the activation of the anaerobic glycolytic pathway.

In *N. granulata* in normoxia, the HIF-1 α gene expression is high in jaw muscle compared to hepatopancreas. This distinct pattern in the expression of HIF-1 α was also observed in other crustaceans. In *Litopenaeus vannamei* in normoxia or subjected to environmental hypoxia the mRNA level of α subunit of HIF-1 is higher in the gills than in hepatopancreas and muscle (Soñanez-Organis et al. 2009). Recently, Hardy et al. (2012) showed that in *C. sapidus* subjected to hypoxia for 1 h, the expression of HIF-1 α was tissue-specific and, in muscle, dependent on the type of muscle fiber.

In the present study, when the crabs were exposed to 1 h hypoxic stress the expression of HIF-1 α gene in muscle decreased by 90%, while in hepatopancreas no significant change occurs. In *Litopenaeus vannamei* subjected to different periods of hypoxia, a marked reduction in the expression of HIF-1 α in gills and muscle was observed (Soñanez -

Organis et al. 2009, 2010). Soñanez-Organis et al. (2009) suggest that hypoxia markedly increase the concentration of HIF-1 α protein and that exert a negative feedback on the mRNA levels of HIF-1 α . Previous studies in our laboratory show that anoxia for 1 h increased the PK activity and the mobilization of glycogen in muscle (Marquese et al. 2006). In this work, the hemolymphatic values of lactate and glucose are 1.9 and 3.2 fold higher, respectively, than those observed in normoxia group, and the ratio between lactate/glucose greater than 1 it is a characteristic of this crab (Pellegrino et al. 2008). In *L. vannamei* subjected to hypoxia, but with the HIF-1 α and β gene silenced, the levels of hemolymphatic glucose and lactate were lower as compared with the control values, suggesting the involvement of this gene in the activation of the glycolytic pathway in crustaceans (Soñanez-Organis et al. 2010). As occurred in hepatopancreas of *N. granulata*, Li and Brower (2007) found that the mRNA levels of HIF in *Palaemonetes pugio* were not affected by hypoxia. The authors suggest that the levels of HIF in this species could be controlled post-translationally, as seen in isoforms HIF-1 and HIF-2 in vertebrate.

The results of this study also suggest that in *N. granulata* HIF-1 α participate in the metabolic regulation of the response to hypoxia; however, more specific studies on the glycolytic pathway in different tissues will be needed to clarify this hypothesis.

Comparing the pattern of metabolic response to hypoxia between 1h and 8h of in the muscle and hepatopancreas, we find striking differences between the two hypoxia times.

After 8h of hypoxia the Na⁺/K⁺-ATPase activity in muscle returned to levels similar to those found in crabs in normoxia, although the oxygen consumption by the animal is 80% reduced (Geihs et al. 2013), and might be explained by an increase of 3 fold of the gluconeogenic activity from lactate observed in this tissue at 8h of hypoxia (Maciel et al. 2008). At that time the values of circulating lactate is about 37 fold higher than those observed in animals in normoxia, despite the excretion of lactate to the aquatic environment (Maciel et al. 2008). During 8 h of hypoxia the muscle did not change the concentration of ATP, the protein synthesis capacity and the pyruvate oxidation. However, Maciel et al. (2008) observed at 8 h of hypoxia a marked reduction in the levels of glycogen and the lactate oxidation in the jaw muscle. In our study, the oxidation capacity was taken from pyruvate, probably, it would be derived from the use of circulating glucose or amino acid such as alanine or glycine which have high concentrations in the hemolymph of this crab (Schein 1999). Geihs et al. (2013) found a marked reduction in the ATP locomotor muscle after the first hour of hypoxia, this would be explained by the difference in function and histology between the locomotor and jaw muscles.

In the hepatopancreas the metabolic pattern of response to 8 h hypoxia is differentiated from those found in muscle. In hepatopancreas Na⁺/K⁺-ATPase activity was not affect-

ed by 8h of hypoxia, as well as the oxidation of pyruvate. On the other hand, the protein synthesis, and ATP concentration in the hepatopancreas decreased 63% and 75%, respectively. Oliveira and Da Silva (2001) showed that in *N. granulata* subjected to anoxia for 8h occurs an increase in gluconeogenic capacity from lactate in the hepatopancreas (Oliveira and Da Silva 2000), which would explain the reduced ability of protein synthesis and the ATP levels in this tissue.

The process of post-hypoxia recovery is physiologically important because that is when energy reserves are restored and the accumulated end products are removed.

In the recovery period, the crabs previously exposed to 1h hypoxia maintain in muscle the energy expenditure reduced by decrease in Na^+/K^+ -ATPase activity, despite the return of locomotory activity and oxygen consumption values to normoxia levels (Geihs et al. 2013). This strategy of reducing the consumption of ATP by decreasing the Na^+/K^+ -ATPase activity during reoxygenation is probably related to the metabolic cost of restoring the body's energy reserves and eliminates the accumulated end products.

The jaw muscle expression of HIF-1 α remained low during the post- hypoxic period after 1h hypoxia, probably due to the high concentration of HIF-1 α cellular protein. This hypothesis is supported by the results of Marqueze et al. (2006) that after submitting the *N. granulata* to 1h anoxia and 3h of recovery from anoxia observed a marked increase in PK enzyme activity in jaw muscle, suggesting the maintenance of glycolytic activity during reoxygenation. The authors also found an increase in glucose oxidation in this tissue in the post-anoxia recovery, which is confirmed in the present study by the maintenance of pyruvate oxidation values similar to those of the normoxia group and by the marked reduction of glucose concentration in the hemolymph. Moreover, to reduce energy consumption the *N. granulata* crab keeps the muscle activity of the Na^+/K^+ -ATPase at very low levels during the post-hypoxia reoxygenation after 1h of hypoxia.

In post-hypoxia recovery period after 1h hypoxia, the hepatopancreas decreases energy expenditure by reducing the protein synthesis and the activity of the Na^+/K^+ -ATPase, and the tissue concentration of ATP was probably maintained via oxidation of pyruvate.

In this study, an increase in the expression of HIF-1 α protein gene and a marked reduction of circulating glucose levels were observed, suggesting the role of this gene in the control of glucose metabolism in crustaceans as proposed by Soñanez-Organis et al. (2010).

The increase in the protein synthesis capacity observed at 24h of reoxygenation after 8h of hypoxia, probably, would be involved in the replacement of proteins mobilized during hypoxic stress. On the other hand, the pyruvate oxidation in tissues decreased, likely, due to decreased in the glucose and lactate concentrations to values similar to those of normoxia animals. The marked increase in gluconeogenic and glyconeogenic activities from lactate in

N. granulata jaw muscle and hepatopancreas in the recovery period after 8h hypoxia also contributes to reducing the levels of circulating lactate values (Maciel et al. 2008, Oliveira and Da Silva 2001).

In conclusion, *N. granulata* could be classified as a conformer oxygen, when hypoxia occurs for a short period (1h) the oxygen consumption and the locomotor activity reduce in response to the environmental O₂ levels (Geihs et al. 2013). Moreover, this crab reduces the ATP expenditure decreasing the Na⁺/K⁺-ATPase activity. In longer period of hypoxia with high glucose and lactate levels, the activity of Na⁺/K⁺-ATPase enzyme returns the values similar to those of normoxia, but the reduction in VO₂ and locomotor activity persists (Geihs et al. 2013), however, the animal has energy substrates to face the reduction of oxygen in the environment.

On reoxygenation, the metabolic strategies for the restoration of energy reserves and the removal of accumulated end products vary according to the times of hypoxic stress and reoxygenation and also are tissue specific.

For the first time in *N. granulata* is shown the involvement of HIF-1α in response to hypoxic stress and its possible role in the mobilization of energy substrates, particularly in muscle and hepatopancreas.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. R.S.M.S., L.C.K. and T.L.M. are CNPq fellows. The experiments were performed according to the current Brazilian laws.

References

- Anderson SJ, Taylor AC, Atkinson JA (1994) Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.*, 108 (4): 515-522.
- Barnes H, Blackstock J (1993) Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12: 103-118.
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing of principle protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Buck L, Hochachka PW (1993) Anoxic suppression of Na⁺-K⁺-ATPase and constant membrane potential in hepatocytes: support for channel arrest. *Am. J. Physiol.* 265: R1020-R1025.

- Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca²⁺ stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157: 375-380.
- Da Silva-Castiglioni D, Oliveira GT, Buckup L (2010) Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 156: 436-444.
- Dawson NJ, Storey KB (2012) An enzymatic bridge between carbohydrate and amino acid metabolism: regulation of glutamate dehydrogenase by reversible phosphorylation in a severe hypoxia-tolerant crayfish. *J Comp Physiol B* 182: 331–340.
- De Oliveira UO, Rosa Araujo AS, Belló-Klein A, Da Silva RSM, Kucharski LC (2005) Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp Biochem Physiol* 140 B: 51-57.
- Drach P, Tchernigovtzeff C (1967) Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. *Vie Milieu* 18: 595-607.
- Felder DL (1979) Respiratory adaptations of the estuarine mud shrimp *Callinassa jamaicensis* (Schmitt, 1935) (Crustacea, Decapoda, Talleassinidea). *Buol. Bull.* 157: 125-137.
- Gåde G (1983) Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J. Exp. Zool.* 228: 415-429
- Geihs MA, Maciel FE, Vargas MA, Cruz BP, Nery LEM (2013) Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 445: 69-78.
- Gorr TA, Wichmann D, Hu J, Hermes-Lima M, Welker AF, Terwilliger N, Wren JF, Viney M, Morns S, Nilsson GE, Deten A, SoUz J, Gassmann M (2010) Hypoxia tolerance in animals: biology and application. *Physiol Biochem Zool* 83:733-752.
- Hardy KM, Follett CR, Burnett LE, Lema SC (2012) Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue- and muscle fiber type-dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, *Callinectes sapidus*. *Comp Biochem Physiol* 163 A: 137-146.
- Head JM (2010) Effects of hypoxia on hemocyanin regulation in *Cancer magister*: possible role of hypoxia-inducible factor-1. *J Exp Mar Biol Ecol* 386: 77-85.
- Hervant F, Mathieu J, Garin D, Freminet A (1995) Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Physiol. Zool.* 68: 223-244.
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol* 130B: 435–459.

- Isani G, Cattani O, Carpena E, Tacconi S, Cortesi P (1989) Energy metabolism during anaerobiosis and recovery in the posterior adductor muscle of the bivalve *Scapharca inaequivalis* (Bruguieri). *Comp. Biochem. Physiol. B.* 93: 193-200.
- Kucharski LCR, Da Silva RSM (1991) Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 100: 599-602.
- Lewis JM, Costa I, Val AL, Almeida-Val VMF, Gamperl AK, Driedzie WR (2007) Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. *J. Exp. Biol.*, 210: 1935-1943.
- Li T, Brouwer M (2007) Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: molecular characterization and response to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 147: 11-19.
- Lutz P, Storey KB (1997) Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: Dantzler WH (ed.) *Comparative Animal Physiology*. Oxford University Press, New York, pp. 1479-1522.
- Maciel JE, Souza F, Valle S, Kucharski LC, Da Silva RMS (2008) Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. *Comp Biochem Physiol* 151 A: 61-65.
- Marqueze A, Kucharski LC, Da Silva RMS (2006) 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* 332: 198-205.
- Marqueze A, Ribarcki F, Kirst I, Kucharski LC, Da Silva RMS (2011) Glucose metabolism in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets: anoxia and recovery. *J Exp Mar Biol Ecol* 404: 40-46.
- Oliveira GT, Rossi IC, Da Silva RSM (2001) Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar Biol* 139:335–342.
- Oliveira G T, Eichler P, Rossi I C, Da Silva R S M (2004) Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high protein or carbohydrate rich diets. *J Exp Zool A* 301: 240-289.
- Pellegrino R, Kucharski LC, Da Silva RSM (2008) Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 358: 144-150.
- Ramnanan CJ, Storey KB (2006) Suppression of Na⁺/K⁺-ATPase activity during estivation in the land snail *Otala lactea*. *J. Exp. Biol.* 209: 677-688.

- Richardson NA, Anderson AJ, Sara VR (1997) The effects of insulin/IGF-1 on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen Comp Endocrinol* 105: 287-293.
- Rossetti CL (2010) Determinação da glicemia e das reservas de glicogênio e de fosfogênio em tecidos de caranguejos *Neohelice granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos à anoxia e à fase de recuperação da anoxia. Master, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Santos E A, Baldisseroto B, Bianchini A, Colares E P, Nery L E M, Manzoni GC (1987) Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.*, 88A (1): 21-25.
- Schein V (1999) Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851). Master, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5680–5684.
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757–23763.
- Soñanez-Organis JG, Peregrino-Uriarte AB, Gómez-Jiménez S, López-Zavala A, Forman HJ, Yepiz-Plascencia G (2009) Molecular characterization of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and tissue specific expression under hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 150: 395-405.
- Soñanez-Organis JG, Racotta IS, Yepiz-Plascencia G (2010) Silencing of the hypoxia inducible factor 1 –HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J Exp Mar Biol Ecol* 393: 51-58.
- Staples JF, Buck LT (2009) Matching cellular metabolic supply and demand in energy-stressed animals. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 153: 95-105.
- Storey KB, Storey JM (1990) Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q Rev Biol* 65:145–174.
- Storey KB, Storey JM (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol. Rev. Camb. Phil. Soc.* 79: 207-233.
- Storey KB, Storey JM (2007) Tribute to P. L. Lutz: putting life on “pause” – molecular regulation of hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 210: 1700-1714.

- Torres ILS, Camaro CD, Silveira-Cucco SN, Michalowski MB, Corrêa JB, Perry MLS, Dalmaz C (2001) Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. *J. Med. Biol. Res.* 34: 111-116.
- Turcato GS (1990) Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Master, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Vinagre APS, Da Silva RSM (1992) Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A: 579-583.
- Vinagre APS, Da Silva RSM (2002) Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Can. J. Zool.* 80: 1413-1421.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5510-5514.

Figure Legends

Figure 1. Effects of hypoxia and post-hypoxia recovery periods on Na⁺/K⁺-ATPase activity in the *N. granulata* jaw muscle and hepatopancreas. Values represent mean ± SD, *n*=6-12 crabs in each group.

^a – different mean values of the control group (normoxia) (*p*<0.05).

Figure 2. Effect of hypoxia and post-hypoxia recovery on the conversion of ¹⁴C-leucine to ¹⁴C-proteins in the *N. granulata* jaw muscle and hepatopancreas. Values represent mean ± SD, *n*=4-8 crabs in each group.

^a – different mean values of the control group (normoxia) (*p*<0.05).

^b – different mean values of the hypoxia 1h group (*p*<0.05).

^c – different mean values of the 3h post 8h hypoxia recovery group (*p*<0.05).

Figure 3. Effects of hypoxia and post-hypoxia recovery periods on ATP concentration in the *N. granulata* jaw muscle and hepatopancreas. Values represent mean ± SD, *n*=4-8 crabs in each group.

^a – different mean values of the control group (normoxia) (*p*<0.05).

^b – different mean values of the hypoxia 8h group (*p*<0.05).

Figure 4 Effects of hypoxia and post-hypoxia recovery periods on ¹⁴CO₂ formation in the *N. granulata* jaw muscle and hepatopancreas. Values represent mean ± SD, *n*=5-6 crabs in each group.

^a – different mean values of the control group (normoxia) (*p*<0.05).

Figure 5 Effects of hypoxia and post-hypoxia recovery periods on gene expression of the hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) in the *N. granulata* jaw muscle and hepatopancreas. Values represent mean ± SE, *n*=5-6 wells.

^a – different mean values of the control group (normoxia) (*p*<0.05).

Figure 1

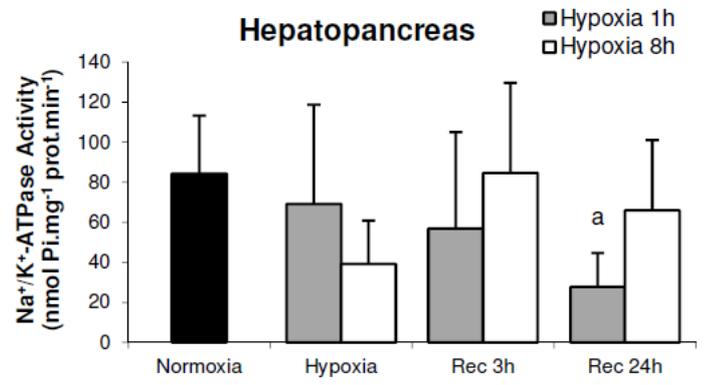
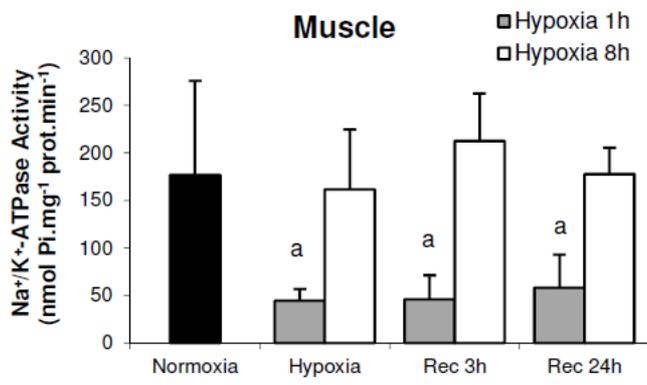


Figure 2

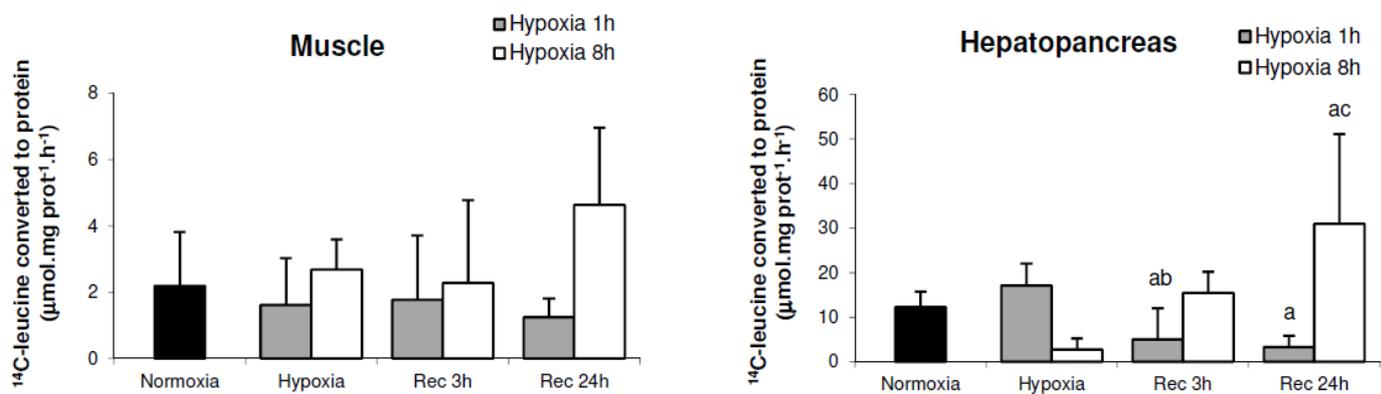


Figure 3

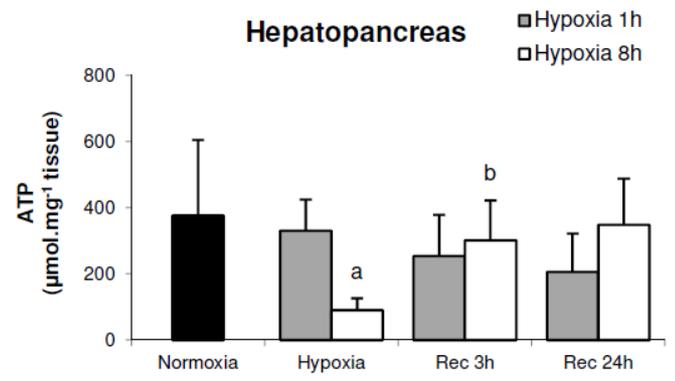
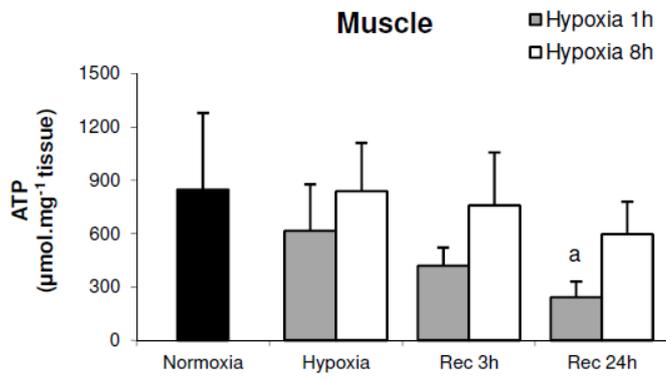


Figure 4

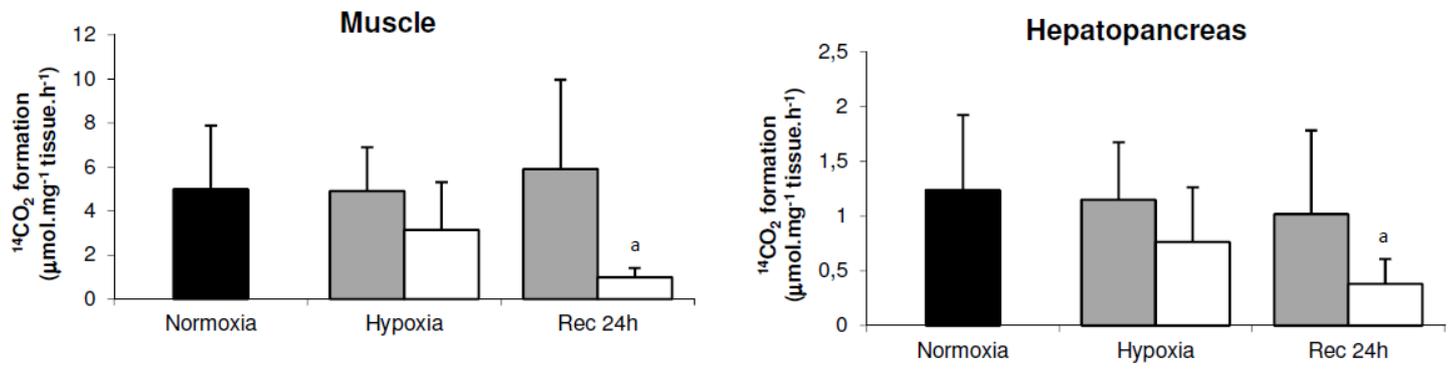


Figure 5

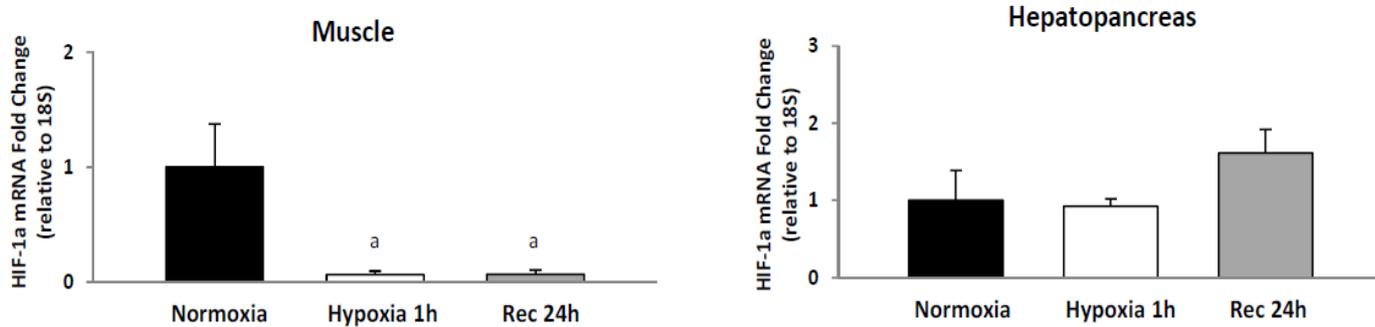


Table 1: Hemolymph glucose (mmol.L⁻¹) and lactate (mmol.L⁻¹) levels in *N. granulata* submitted to hypoxia (1 and 8h) and post-hypoxia recovery (3 and 24h).

| | Hemolymph Glucose (mmol.L ⁻¹) | | Hemolymph Lactate (mmol.L ⁻¹) | |
|----------|---|--------------------------|---|----------------------------|
| | 1h hypoxia | 8h hypoxia | 1h hypoxia | 8h hypoxia |
| Normoxia | 0.20 ± 0.13 | 0.20 ± 0.13 | 0.58 ± 0.78 | 0.58 ± 0.78 |
| Hypoxia | 0.38 ± 0.17 ^a | 2.31 ± 1.14 ^a | 1.87 ± 0.68 ^a | 21.67 ± 10.17 ^a |
| Rec 3h | 0.15 ± 0.03 ^b | 0.22 ± 0.09 ^c | 0.45 ± 0.39 ^b | 11.12 ± 6.88 ^{ac} |
| Rec 24h | 0.27 ± 0.13 | 0.19 ± 0.08 | 0.26 ± 0.09 | 0.17 ± 0.15 ^d |

Values are expressed as means ± SD of 3-11 samples.

(a) – mean values are significantly different from the control group (normoxia) (p<0.05).

(b) – mean values are significantly different from the hypoxia 1h group (p<0.05).

(c) – mean values are significantly different from the hypoxia 8h group (p<0.05).

(d) – mean values are significantly different from the 3h post 8h hypoxia recovery group (p<0.05).