

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS – FISILOGIA**

**EFEITO DA ANOXIA E DA RECUPERAÇÃO SOBRE O  
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM  
*CHASMAGNATHUS GRANULATUS* ALIMENTADOS COM  
DIETA RICA EM PROTEÍNAS OU RICA EM  
CARBOIDRATOS**

**FABIANA PINTO RIBARCKI**

**ORIENTADORA:**

**Dra. Roselis Silveira Martins da Silva**

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

**PORTO ALEGRE, 2007**

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
<b>Coleta dos animais</b> .....	<b>22</b>
<b>Tratamento dos animais</b> .....	<b>22</b>
<b>1. Procedimento Experimental</b> .....	<b>23</b>
1.1 Procedimentos In vitro .....	24
1.1.1 Captação de Glicose .....	25
1.1.2 Síntese e Mobilização de Glicogênio .....	26
1.1.3 Síntese de Lipídeos .....	27
1.1.4 Formação de CO <sub>2</sub> .....	28
1.1.5 Determinações Bioquímicas.....	29
1.2 Determinação das Proteínas Teciduais.....	29
1.3 Determinação da Glicose Hemolinfática.....	29
<b>2. Tratamento Estatístico</b> .....	<b>29</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
1. Captação de glicose no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de <i>C. granulatus</i> submetidos a anoxia e a recuperação.....	30
2. Síntese de glicogênio no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de <i>C. granulatus</i> submetidos a anoxia e a recuperação.....	32

3. Mobilização de glicogênio no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de <i>C. granulatus</i> submetidos a anoxia e a recuperação .	34
4. Síntese de lipídeos no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de <i>C. granulatus</i> submetidos a anoxia e a recuperação.....	40
5. Formação de CO <sub>2</sub> no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de <i>C. granulatus</i> submetidos a anoxia e a recuperação. ....	43
6. Concentração de glicose hemolinfática de <i>C. granulatus</i> submetidos a anoxia e a recuperação. ....	46
<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos àqueles que, de forma direta ou indireta, ajudaram na conclusão deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Dr. Roselis Silveira Martins Da Silva, por ter acreditado em mim e confiado seu tempo neste trabalho.

À mais que colega, Inajara Kirst, por tantas horas dedicadas e por tantos momentos divididos. Por ter crescido comigo nestes anos, em todos os aspectos.

Não posso deixar de lembrar o auxílio sempre tão importante dos meus pais, sem os quais eu não teria chegado, de forma alguma, até aqui.

Agradeço também a colaboração da minha professora e também amiga Anapaula Vinagre, por continuar comigo, sempre, em todos os momentos: profissionais, pessoais.

Um agradecimento especial ao meu querido Rafael, por sempre, sempre, ter me incentivado e apoiado em todas as horas.

Obrigado também a todos os amigos e colegas do laboratório, em especial à Sandra, ao Zé, ao Ricki, à Danica, ao Gabi, ao Vanderlei, ao Alan, ao Glauco, ao Matheus, ao Bira, ao Professor Luis, que me ajudaram muito a concretizar este trabalho.

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar os efeitos de diferentes dietas e da anoxia e fase de recuperação, sobre o metabolismo de carboidratos no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*.

Os animais foram alimentados diariamente com carne bovina (dieta rica em proteínas, HP) e arroz cozido (dieta rica em carboidratos, HC) *ad libitum*, e mantidos em aquários com aeração constante, salinidade 20‰, temperatura de 25°C e fotoperíodo natural, durante 15 dias. Após este período, os animais foram submetidos á 1 hora de anoxia (período em que a aeração da água dos aquários foi substituída por Nitrogênio, até que a oxigenação chegasse a zero), e 3 horas de recuperação (período onde a água desoxigenada foi novamente substituída por água oxigenada, em normóxia).

O músculo da mandíbula e o hepatopâncreas dos animais foram retirados e submetidos aos experimentos de captação de glicose, síntese e mobilização de glicogênio, síntese de lipídeos e produção de CO<sub>2</sub>. Amostras de hemolinfa foram retiradas para a determinação das concentrações de glicose.

Nos experimentos de captação de glicose no músculo e no hepatopâncreas, não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Nos experimentos de síntese de glicogênio, a recuperação aumentou a síntese ( $p < 0,05$ ) em 5 vezes no músculo do grupo HC, assim como no grupo HP, quando comparados ao grupo controle e a outra dieta.

Os valores de síntese de lipídeos a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo de *C. granulatus* apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle ( $p < 0,05$ ). Os animais controle HC apresentaram uma diminuição nos valores de síntese de lipídeos quando comparados ao grupo controle. A anoxia reduziu os valores ( $p < 0,05$ ) de síntese de lipídeos no músculo dos animais HP. A anoxia elevou os valores de síntese no hepatopâncreas do grupo HP, e três horas de recuperação foram suficientes para retornar a valores iniciais. Esta diferença também foi significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à outra dieta.

A síntese de glicogênio foi superior no músculo de animais HC e no hepatopâncreas de animais HP durante a recuperação. Uma hora de anoxia diminuiu os valores de mobilização no músculo do grupo HC e em três horas os valores iniciais retornam, tempo que não foi suficiente para recuperar os valores do mesmo tecido no grupo HP. No hepatopâncreas, o grupo HP diminuiu a mobilização de glicogênio durante a anoxia e recuperação, enquanto o grupo HC não apresenta variações nos valores de mobilização.

Nos experimentos de formação de  $\text{CO}_2$  no músculo da mandíbula de *C. granulatus* foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controles. O grupo HP apresentou valores maiores em 50% de formação de  $\text{CO}_2$  no músculo em relação ao grupo HC. Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais do grupo HC. Os animais do grupo HP submetidos a anoxia e a recuperação, apresentaram valores inferiores e significantes ( $p < 0,05$ ) ao grupo controle. No hepatopâncreas, a formação de  $\text{CO}_2$  se elevou ( $p < 0,05$ ) durante a anoxia no grupo HP. Foram encontradas diferenças significativas entre

os grupos controle. O grupo HC apresentou valores de formação de CO<sub>2</sub> no hepatopâncreas menores quando comparados ao grupo HP.

Os valores de glicose na hemolinfa de *C. granulatus* alimentados com dieta HC e HP, e submetidos a anoxia apresentaram uma elevação quando comparados ao grupo controle. O grupo anoxia HC e recuperação HC também apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados à dieta HP. Os valores do grupo HC foram maiores que o grupo HP.

Os efeitos metabólicos da anoxia e da subsequente recuperação sobre o metabolismo da glicose no músculo e no hepatopâncreas de *C. granulatus* foram marcantes em relação ao grupo em normóxia.

## INTRODUÇÃO

O *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) pertencente à família Verunidae (Decapoda, Crustacea), é uma espécie típica de estuário que evoluiu a partir de formas marinhas. Esta espécie habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, passando por toda a costa do Uruguai até o golfo de São Martin, na Argentina (Boschi, 1964).

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

Esta espécie de caranguejo ocupa preferencialmente as faixas de supra e mesolitoral, onde constroem tocas que podem formar galerias com profundidades variáveis, de acordo com os níveis das marés e do lençol freático, mantendo sempre água no fundo das tocas. A concentração de  $O_2$  dissolvido na água pode variar de 2,80 mg $O_2$ /L a 11,78 mg $O_2$ /L, podendo chegar a valores próximos a zero conforme a estação do ano (Turcato, 1990).

Em estuários, as variações extremas dos fatores ambientais exercem um controle seletivo e severo sobre as espécies que habitam essas áreas. Mudanças

tanto comportamentais como estruturais e funcionais ocorrem nos organismos lacustres e estuarinos, capacitando-os a tolerar as alterações freqüentes das características físico-químicas do meio (Kinne, 1993 apud Miranda, 1994; Gilles, 1997). Os seres vivos que vivem em ambientes aquáticos com grande flutuação de salinidade, constantemente sofrem alterações no volume celular devido à perda ou ao ganho de água (Yancey e cols., 1982).

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

Em resposta ao estresse da anoxia ambiental, muitos animais aumentam o período de sobrevivência, usando a depressão metabólica, como uma estratégia possibilitando uma redução do gasto metabólico entre 10% e 30%, quando comparado aos valores em normóxia (Lutz e Storey, 1997; Hochachka e Lutz, 2001).

Nestas situações de diminuição de disponibilidade de oxigênio, a transição para o estado metabólico de normóxia é acompanhada por um rápido e grande

aumento na captura de oxigênio, assim como o aumento da concentração de oxigênio nos tecidos. Esta transição é funcionalmente análoga à reperusão que ocorre nos mamíferos, após uma esquia. (Storey, 1996b).

Segundo D'Incao e cols. (1990), o *Chasmagnathus granulatus* é uma espécie oportunista. Através da análise do conteúdo estomacal destes caranguejos foram verificados, no outono e no inverno, restos de vegetais; na primavera maior frequência dos itens de origem animal; e no verão, equilíbrio entre os dois itens alimentares. Eventualmente, o *Chasmagnathus granulatus* comporta-se como carnívoro, atacando sua própria comunidade (canibalismo), peixes e outros crustáceos, sendo então classificado como omnívoro-detritívoro (Botto e Irigoyen, 1980).

Durante o inverno, quando o *C. granulatus* permanece em sua toca, a frequência dos itens de sua dieta no estômago é reduzida, indicando a diminuição da disponibilidade de substrato energético, e os caranguejos reduzem o gasto energético (D'Incao e cols., 1990) Por isso, *C. granulatus* é adaptado para mobilizar suas reservas e sobreviver em períodos naturais de jejum, como o inverno.

O caranguejo *C. granulatus*, dada a excelente adaptação às condições de laboratório e a capacidade de se adaptar a variações de salinidade e de teor de O<sub>2</sub> no seu habitat, é considerado um modelo biológico muito adequado para a investigação sobre o controle do metabolismo intermediário em crustáceos (Kucharski, 1990).

As principais vias do metabolismo de carboidratos começam ou terminam com glicose. A glicose é armazenada principalmente sob a forma de glicogênio em diferentes tecidos, tanto em vertebrados como em invertebrados. Estudos sobre o metabolismo energético em crustáceos têm demonstrado que fatores hormonais, ambientais e nutricionais controlam a homeostase da glicose (Santos e cols., 1988; Sedlmeier, 1985; Lynch and Weeb, 1973; Dean and Verberg, 1965; Meenakshi and Sheer, 1961).

Os estudos sobre o metabolismo de carboidratos em crustáceos decápodes têm demonstrado a presença das vias da glicogênese, da glicogenólise, da glicólise, da gliconeogênese e da neoglicogeniogênese em diferentes tecidos (Chang e O'Connor, 1983; Loret e cols., 1989; Loret e Devos, 1992; Vinagre e Da Silva, 1992; Schimitt e Santos, 1993; Oliveira e Da Silva, 1997, Marqueze e cols., 2006).

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. O ciclo de armazenamento/mobilização de glicogênio e os valores de glicose hemolinfática apresentam flutuações marcantes, dependendo, entre outros fatores, do estágio da muda, da estação do ano, da dieta oferecida, do estado alimentar, do ciclo circadiano, da salinidade do meio ambiente e do teor de oxigênio dissolvido na água (Chang e O'Connor, 1983; Herreid e Full, 1988, Loret e cols., 1989; Vinagre e Da Silva, 1992; Kucharski e Da Silva, 1991a, b; Morries e Airriess, 1998; Oliveira e cols., 2004 a;b).

Nos crustáceos, a glicose tem cinco destinos principais: síntese de mucopolissacarídeos, síntese de quitina, síntese de ribose e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), formação de piruvato e síntese de glicogênio (Hochachka e cols., 1970; Herreid e Full, 1978).

A ausência de um depósito central de glicogênio seria uma adaptação importante para animais, que em seus *habitat* 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 contraste a outros invertebrados, os crustáceos utilizam somente uma via de glicólise anaeróbia, que é a fermentação de glicogênio em lactato (Bridges e Brand, 1980; Aardt, 1988; Hervant e cols., 1995, 1997, 1999 a e b ).

Na literatura está bem documentado que o L-lactato é o principal produto do metabolismo anaeróbio em crustáceos, sendo acumulado na hemolinfa e em diferentes tecido após situações da anoxia ou hipóxia, tanto ambiental como funcional (Van Aardt, 1988; Anderson e cols., 1994; Henry e cols., 1994; Hervant e cols., 1995; Zou e cols., 1996; Hervant e cols., 1996; Wachter e cols., 1997; Hervant e cols., 1997; Oliveira e cols., 2004 a).

Durante o exercício extenuante, os crustáceos produzem altas concentrações de L-lactato, sendo este metabólito responsável pela acidose induzida pelo exercício físico nesses animais (Wood e Randall, 1981; Henry e cols., 1994; Morris e Adamczewska, 2002).

O aumento da concentração de L-lactato estaria associado a uma marcante mobilização do glicogênio tecidual (Chang e O'Connor, 1983; Hervant e cols., 1999; Morris e Adamczewska, 2002; Oliveira e cols., 2004 a).

Trabalhos realizados com *C. granulatus* demonstraram que a administração de dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) produz alterações no metabolismo intermediário de acordo com o teor de carboidratos presente na dieta (Kucharski e Da Silva, 1991b; Vinagre e Da Silva, 1992).

Em caranguejos adaptados a uma dieta HC as concentrações de glicose na hemolinfa e de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo são significativamente maiores que aquelas constatadas em animais alimentados com a dieta HP (Kucharski e Da Silva, 1991a).

Em *C. granulatus* alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à anoxia ambiental por 8 horas, os valores de L-lactato na hemolinfa aumentam 14 vezes, porém não foram constatadas diferenças significativas entre os animais mantidos com as dietas HC e HP. Durante a fase de recuperação, o L-lactato hemolinfático retorna a valores semelhantes ao do grupo controle mais lentamente no grupo HC que no grupo HP. O glicogênio muscular parece ser a principal fonte deste L-lactato (Oliveira e cols., 2004 a).

Durante a fase de recuperação, a gliconeogênese hepatopancreática teria um papel fundamental na metabolização do L-lactato formado ao longo do período de anoxia, somente nos animais alimentados com a dieta HP (Oliveira e cols., 2004a).

Em caranguejos adaptados à dieta HC ou HP o padrão metabólico de resposta ao jejum é alterado em função da composição da dieta previamente administrada ao animal (Vinagre e Da Silva, 1992; Oliveira e cols., 2004 b).

Em caranguejos alimentados com a dieta HP a concentração de glicose na hemolinfa é mantida principalmente por meio da gliconeogênese hepatopancreática a partir de aminoácidos e de carbonos derivados da mobilização de polissacarídeos musculares. Já no grupo mantido previamente com a dieta HC, o glicogênio hepatopancreático seria a principal fonte de energia durante o jejum, embora, ocorra um aumento da capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas após 15 dias de jejum (Oliveira e cols., 2004b). Contudo, Oliveira e Da Silva (1997) não evidenciaram aumento da capacidade gliconeogênica e da atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) no hepatopâncreas de *C. granulatus* alimentado com a dieta HP, como ocorre em vertebrados e outros invertebrados (Moon, 1988; Rosas e cols., 2001). Porém, no músculo a capacidade gliconeogênica é significativamente maior nos caranguejos alimentados com a dieta HC do que naqueles mantidos com a dieta HP (Pellegrino, 2006).

Oliveira e cols. (2001), submetendo o *C. granulatus* por 8 horas à anoxia e após, 12 horas à recuperação pós-anoxia, verificaram que os valores de glicose na hemolinfa também aumentam significativamente durante o período de 8 horas de anoxia ambiental. Contudo, nos animais alimentados com a dieta HC esses valores foram significativamente maiores que aqueles dos caranguejos mantidos com a dieta HP. Durante a fase de recuperação, os níveis de glicose na hemolinfa

voltam rapidamente a valores semelhantes aqueles dos animais em normóxia, não sendo constatada diferença significativa entre os animais alimentados com as dietas HC e HP. Nesses animais, após 12 horas em recuperação, os valores de captação de glicose no hepatopâncreas apresentam-se significativamente reduzidos quando comparados aqueles dos animais em normóxia (controle); o aumento na captação de glicose deve ter ocorrido nas primeiras horas de recuperação. Contudo, no período de recuperação, a síntese de glicogênio aumenta, atingindo valores superiores aqueles dos animais em normóxia e em anoxia. A mobilização do  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no hepatopâncreas está aumentada durante os períodos de anoxia estudados e reduzida na fase de recuperação. As atividades das enzimas glicogênio fosforilase total e na forma  $\alpha$  aumentam nas primeiras horas de anoxia, acarretando uma diminuição significativa nos valores de glicogênio hepatopancreático. Durante a fase de recuperação a relação das enzimas glicogênio sintase /glicogênio fosforilase  $\alpha$  aumenta (Oliveira e cols., 2001)

A gliconeogênese é a via responsável pela síntese *de novo* de glicose a partir de precursores como lactato, glicerol, aminoácidos, piruvato e propionato (Moon, 1988; Marks e cols., 1996; Corssmitt e cols., 2001).

Segundo Moon (1988), a gliconeogênese seria uma via filogeneticamente antiga, visto que suas enzimas são encontradas desde fungos até mamíferos como o homem. Em vertebrados essa via é muito estudada; em mamíferos ocorre no fígado, nos rins e no intestino delgado (Marks e cols., 1996; Corssmitt e cols., 2001; Mithieux e cols., 2004; Habold e cols., 2005). Contudo, em invertebrados, pouco se sabe sobre a síntese *de novo* da glicose. A precisa contribuição dessa

via na manutenção da glicemia difere conforme a espécie e a sua capacidade de adaptação bioquímica às mudanças dos níveis de glicose circulantes.

Em vertebrados, o metabolismo hepático de carboidratos, mais especificamente a gliconeogênese, é conhecido por modular as mudanças de volume celular de hepatócitos (Lang, 1998; Quillard, 1997).

A literatura descreve poucos estudos envolvendo alterações ambientais e a atividade da via gliconeogênica em invertebrados. Muitas vezes os efeitos encontrados podem estar mascarados por alterações sazonais do metabolismo e das reservas metabólicas (Moon, 1988).

As atividades das quatro enzimas-chave da gliconeogênese, piruvato carboxilase (PC, EC 6.4.1.1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, EC 4.1.1.32), frutose-1-6-bifosfatase (FBFase, EC 3.1.3.11) e glicose-6-fosfatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) têm sido verificadas em uma variedade de espécies de vertebrados e invertebrados. A distribuição, principalmente da PEPCK, entre diferentes frações celulares, varia conforme as espécies (Kraus-Friedmann, 1984; Moon, 1988; Corssmitt e cols., 2001). Em humanos, a PEPCK se localiza tanto no citosol como na mitocôndria (Marks e cols., 1996; Corssmitt e cols., 2001). Em ratos e camundongos, a PEPCK hepática é principalmente citoplasmática; em outros mamíferos, como nos coelhos e nos porcos da Índia (Wiese e cols., 1991), está presente nos dois compartimentos do hepatócito. Em aves, a PEPCK hepática é mitocondrial (Hanson e Reshef, 1997).

Em invertebrados, a via gliconeogênica e a atividade das enzimas-chave dessa via foram evidenciadas em uma variedade de espécies. Mustafa e cols. (1983) demonstraram a conversão de vários precursores gliconeogênicos, quando

fornechos exogenamente sob condições aeróbicas, em glicogênio nos tecidos de *Tubifex sp*, um Oligochaeta anaeróbico facultativo. A capacidade gliconeogênica a partir de alanina, ácido aspártico ou ácido glutâmico foi demonstrada, *in vitro*, no coleoptero *Tenebrio molitor* (Gourdoux e cols., 1983). Os autores verificaram que a alanina foi o precursor preferencial utilizado para a conversão em trealose nesse besouro.

A presença de enzimas da via gliconeogênica foi verificada em corpos gordurosos de baratas (Storey e Baleiy, 1978) e no parasita *Schistosoma mansoni* (Tielens e cols., 1991). Zammit e Newsholme (1978) verificaram a atividade da PEPCCK em músculo do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus* e da lagosta *Homarus vulgaris* e sugeriram que essa enzima catalisa a conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato, sendo parte da via de oxidação de alguns aminoácidos nos músculos desses animais.

Em brânquias do mexilhão *Modiolus demissus*, a PEPCCK apresenta o peso molecular de 70 KDa e é predominantemente citosólica (Harlocker e cols., 1991). No hepatopâncreas e no manto do molusco *Megalobulimus oblongus* a atividade da enzima PEPCCK é predominante mitocondrial, entretanto, no coração e no diafragma a maior atividade foi constatada na fração citosólica (Dias 1996; 2000).

Em crustáceos, a capacidade gliconeogênica foi constatada no hepatopâncreas (Munday e Poat, 1971; Oliveira e Da Silva, 1997), nas brânquias (Thabrew et al., 1971; Chittó, 2005), nos hemócitos (Johnston e Davies, 1972) e no músculo (Schein e cols., 2004). A atividade da PEPCCK e da FBFase foi demonstrada em tecidos do siri *Callinectes sapidus* (Lallier e Walsh, 1991), de

caranguejos *Chaceon fenneri* e *Chaceon quinquendes* (Walsh e Henry, 1990) e em crustáceos hipógenos e epígenos (Hervant, 1996).

Oliveira e Da Silva (1997) demonstraram, pela primeira vez, a presença da via gliconeogênica e a atividade da PEPCK no hepatopâncreas do caranguejo *C. granulatus*. Nesse trabalho, a comparação da capacidade de síntese de glicose a partir de [<sup>14</sup>C] - alanina com aquela a partir de [<sup>14</sup>C] - lactato, demonstrou que o substrato preferencial para a síntese de glicose pelo hepatopâncreas é a alanina, e em animais alimentados, a capacidade intrínseca deste tecido em sintetizar glicose é alta e independe da composição da dieta administrada aos caranguejos. Os autores sugerem que a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica permite ao *C. granulatus* adaptar-se às variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, a temperatura, o ciclo de marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose, principal substrato energético em crustáceos.

Estudando o efeito de diferentes tempos de jejum sobre a capacidade gliconeogênica, a concentração de glicogênio hepatopancreático e a concentração de glicose na hemolinfa de *C. granulatus* alimentados previamente com dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos, Oliveira e cols. (2004b) constataram, nos animais alimentados com a dieta rica em proteínas, que a concentração de glicose na hemolinfa foi mantida principalmente pela gliconeogênese, enquanto nos animais mantidos previamente com a dieta rica em carboidratos, o glicogênio foi o principal substrato energético utilizado durante o jejum, embora após quinze dias de privação de alimento tenha aumentado a produção de glicose a partir de alanina.

Em caranguejos *C. granulatus*, mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas e submetidos ao estresse por anoxia ambiental durante 8 horas, as concentrações de lactato e glicose na hemolinfa aumentaram 10-14 vezes quando comparadas aquelas do grupo normóxia. No período de recuperação, os caranguejos alimentados com uma dieta rica em proteínas reduziram cerca de 93% a concentração de L-lactato hemolinfático. Essa diminuição foi acompanhada pelo aumento da conversão de [<sup>14</sup>C]-L-lactato em [<sup>14</sup>C]-glicose, e pela elevação da atividade das enzimas lactato desidrogenase e PEPCK hepatopancreáticas. Entretanto, nos caranguejos mantidos com a dieta rica em carboidratos, o valor de lactato hemolinfático diminuiu lentamente durante a recuperação (Oliveira e cols., 2004a).

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática durante o processo de adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo *C. granulatus*. Animais alimentados com dieta rica em proteínas e submetidos ao estresse hiposmótico durante um período de 6 dias aumentaram a capacidade gliconeogênica a partir de [<sup>14</sup>C]-alanina- aos 3 dias de estresse. Nos animais submetidos a uma dieta rica em carboidratos o aumento somente foi verificado aos 6 dias de estresse. Porém, quando o substrato utilizado era o ácido <sup>14</sup>C-lático, ambos os grupos apresentaram uma redução da capacidade gliconeogênica a partir de 3 dias de estresse hiposmótico. Em ambas as dietas, o aumento da capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas, durante o estresse hiposmótico, foi acompanhado pela elevação da atividade da enzima PEPCK mitocondrial. Rosas e cols. (2001) demonstraram que a atividade da

PEPCK hepatopancreática aumenta em resposta a baixa salinidade no camarão *Litopenaeus vannamei*.

Recentemente, foi realizada a clonagem molecular da PEPCK muscular (GenBank AY074922) do caranguejo *C. granulatus* que confirmou sua localização na fração mitocondrial (Schein e cols., 2004). A seqüência nucleotídica do cDNA da PEPCK do *C. granulatus* tem 80% de semelhança com a seqüência da PEPCK de outros Malacostraca. Também foi verificada a expressão da enzima no hepatopâncreas, no sistema nervoso, no coração e nas brânquias de *C. granulatus*. Em vertebrados, tem sido demonstrado que a expressão do gene da PEPCK mitocondrial é constitutiva (Hanson e Reshef, 1997). Entretanto, foi constatado um aumento na atividade e nos níveis de RNAm da PEPCK mitocondrial de *C. granulatus* após 1 dia de estresse hiperosmótico, acompanhado do aumento da capacidade gliconeogênese a partir de alanina (Schein et al., 2004). Chittó (2000) verificou que a atividade da enzima PEPCK, nas brânquias posteriores e anteriores do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* no inverno, foi predominante na fração mitocondrial. No verão, não houve variação entre as frações mitocondrial e citosólica nos animais controle, entretanto, somente a atividade da PEPCK citosólica diminuiu após 1 dia de estresse hiperosmótico e após 3 dias de estresse hiposmótico em brânquias anteriores e posteriores, respectivamente, quando comparada ao grupo controle (dados não publicados).

Schein e cols. (2005a) verificaram que a gliconeogênese muscular em *C. granulatus* está envolvida no ajuste metabólico de aclimatação ao estresse osmótico. Entretanto, a resposta da via gliconeogênica ao estresse osmótico é sazonal, modificando-se conforme a estação do ano: inverno ou verão.

Diferenças taxonômicas e ecológicas e/ou geográficas têm sido evocadas para explicar a adoção de uma estratégia energética particular de cada espécie (Percy, 1993).

Em algumas espécies, as reservas de carboidratos, principalmente de glicogênio, são consumidas primeiro do que aquelas de lipídeos, e por últimos, são consumidas as proteínas (Chaisemantin, 1971, Cuzon e Ceccaldi, 1972; Regnault, 1981; Stuck e cols., 1996).

Em outras espécies, o glicogênio pouco contribui para energia em períodos de jejum, e as reservas metabólicas usadas primeiramente são os lipídeos (Schafer, 1968, Sasaki e cols., 1986; Percy, 1993) ou as proteínas (Marden e cols., 1973; Mayzeau, 1976; Hiller-Adams e Chiddress, 1983).

Em *Ocypode quadrata*, os triglicerídeos e o colesterol total na hemolinfa diminuem durante a primavera, enquanto o glicogênio no hepatopâncreas e no músculo das fêmeas aumenta durante o mesmo período. (Vinagre, 2007)

Os principais lipídeos de crustáceos são os lipídeos neutros, entre estes, 90% são triglicerídios (Gilbert e O'Connor, 1970; Allen e cols., 2000). Os lipídios de crustáceos são transportados na hemolinfa por lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Garcia e cols., 2002). Há diversos estudos sobre o metabolismo de lipídios nesses animais, mas a maioria trata da utilização das reservas de lipídeos durante a embriogênese e o período reprodutivo (Sibert e cols., 2004; Rosa e cols., 2005; Calado e cols., 2005; Rosa e Nunes, 2003). O hepatopâncreas parece ser o principal órgão de reserva e fornecedor de lipídeos para o período reprodutivo (Jeckel e cols., 1991; Hasek e Felder, 2005).

Em crustáceos, os lipídeos neutros, principalmente os triglicerídeos, são preferencialmente utilizados durante o jejum, enquanto os lipídeos polares (fosfolipídeos e colesterol) são conservados devido ao seu papel como componentes estruturais da membrana celular (Heath and Barner, 1970; Bourdier e Amblard, 1989; Stuck e cols., 1996).

Estudos também revelam os efeitos da variação sazonal, da concentração de oxigênio no meio, da composição da dieta e do jejum sobre as reservas de lipídios. No krill *E. crustallorophias* os níveis de lipídeos são mais baixos no inverno do que no verão (Nicol e cols., 2004). Camarões *N. gracilis*, que vivem há 1.000 m de profundidade onde a concentração de oxigênio é mínima, possuem triglicerídios como sua maior reserva lipídica (Allen e cols., 2000). O caranguejo decápode *P. granulosa* apresenta um padrão diferenciado de adaptação ao jejum; inicialmente utilizam proteínas como reserva energética e após os lipídeos totais (Comoglio e cols., 2005). O efeito do jejum longo e da realimentação foi estudado em uma espécie de crustáceo hipógeno e em uma espécie epígena por Hervant e Renault (2002). A espécie epígena apresentou uma diminuição de todas as suas reservas energéticas ao longo do jejum, enquanto a espécie hipógena apresentou três fases catabólicas (glicídica, lipídica e proteo-lipídica) ao longo do período de restrição alimentar e uma rápida recuperação de suas reservas energéticas quando realimentados. Os autores sugerem que estas respostas adaptativas são utilizadas por várias espécies subterrâneas como estratégias para sobrevivência em ambientes onde há períodos de restrição alimentar e/ou de oxigênio.

O hepatopâncreas nos crustáceos tem papel secretório de enzimas digestivas, absorção e armazenamento de matéria lipídica (Bunt, 1968., Smith e

cols., 1975), participa do metabolismo de carboidratos, e por isso, parece ser local de gliconeogênese.

Em *C. granulatus* alimentado com dieta rica em proteínas, Vinagre e Da Silva (1992) verificaram que o glicogênio hepatopancreático e muscular parece ser o principal substrato energético utilizado durante o jejum curto. Entretanto, ao final do período de jejum de 8 semanas, os lipídios do hepatopâncreas e do músculo seriam a fonte adicional de energia tanto em animais alimentados previamente com dieta rica em proteínas como naqueles mantidos com dieta rica em carboidratos (Vinagre e Da Silva, 1992).

Em *C. granulatus* o jejum de 3 semanas não alterou a síntese de lipídeos no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias (Vinagre e Da Silva, 2002). Contudo, em caranguejos submetidos a 3 semanas de jejum e 48 horas de realimentação ocorreu uma elevação da síntese de lipídios no hepatopâncreas.

Ao investigarem o efeito da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário em *C. granulatus*, Kucharski e Da Silva (1991a) verificaram que no hepatopâncreas e no músculo as maiores concentrações de glicogênio ocorrem no outono e no inverno, diminuindo na primavera e no verão. A maior reserva de lipídeos no músculo ocorre no verão e diminui no outono e no inverno, enquanto as reservas de lipídios do hepatopâncreas são significativamente elevadas, cerca de 20% do peso do órgão, diminuindo somente no outono. Os autores sugerem que o glicogênio estocado no hepatopâncreas e no músculo seria consumido como substrato energético durante os meses de primavera e verão. Já no outono e no inverno, a reserva de lipídeo muscular seria o principal substrato energético (Kucharski e da Silva, 1991).

Marqueze e cols., em 2006, submetendo *C. granulatus* à 1 hora de anoxia, verificou no músculo, um aumento da atividade da piruvato quinase (PK), da concentração de ATP e uma redução da concentração de glicogênio, assim como a diminuição da produção de CO<sub>2</sub> a partir de lactato em caranguejos alimentados previamente com dieta HP. Em comparação, nos animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos, verificou um decréscimo na atividade da PK e um aumento da produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose. Durante o período de recuperação de 3 horas, em animais alimentados com ambas as dietas, os níveis de glicogênio no músculo da mandíbula não retornaram a valores iniciais, e nos animais alimentados com uma dieta rica em proteína, a produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose foi alta no músculo da mandíbula.

Kucharski e Da Silva (1991 b) verificaram em *C. granulatus* alimentado com uma dieta rica em proteínas um aumento de cerca de 30% na concentração de lipídeos totais no hepatopâncreas, quando comparada àquelas dos animais do campo ou alimentados com uma dieta rica em carboidratos.

Quatro diferentes estratégias adaptativas que permitem a sobrevivência em hipóxia ou anoxia ambiental foram identificadas em crustáceos: 1) manutenção em todos os tecidos de altas concentrações de glicogênio e fosfato (ex. arginina fosfato) em condições aeróbias; 2) utilização de vias anaeróbias para a produção de ATP; 3) redução do gasto energético (Hervant e cols., 1995; Childress e Seibel, 1998) e 4) depressão metabólica. Além disso, a duração e a eficiência do processo de recuperação são de importância funcional, com a rápida reposição

dos valores das reservas energéticas e a remoção dos produtos finais acumulados durante a anoxia (Hervant e cols., 1999).

Respostas comportamentais, respiratórias, circulatórias e de afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub> também foram constatadas em crustáceos, submetidos ao estresse de hipóxia ou anoxia ambiental. Hervant e cols. (1995), após submeterem duas diferentes espécies de crustáceos (*Niphargus rhenorhodanensis* e *Gammarus fossarum*) a uma severa hipóxia ambiental e a fase de recuperação, constataram, em ambas as espécies, na primeira hora de hipóxia, uma diminuição significativa da atividade locomotora. Durante o período de recuperação da hipóxia, os animais aumentaram significativamente a atividade locomotora quando comparados ao grupo hipóxia. Entretanto, no período de recuperação, a atividade de locomoção foi menor quando comparada àquela do grupo controle em normoxia. Os mesmos autores também constataram hiperventilação, em ambas as espécies, nas primeiras horas de hipóxia severa.

No caranguejo *C. granulatus*, Santos e cols. (1987) constataram uma redução do consumo de oxigênio e da atividade de locomoção após duas horas de exposição à hipóxia ambiental. Gonçalves (1993) constatou uma diminuição da atividade motora e da frequência cardíaca em *C. granulatus* submetido à anoxia ambiental durante 12 horas.

Entre os crustáceos, o tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) de exposição a um ambiente anóxico varia de poucas horas, como em *Ornectes limosus* (Gade, 1984) e *Gammarus fossarum* (Hervant e cols., 1995), até vários dias, como em

*Calianassa californiensis* (Thompson e Pritchard, 1969). Em *C. granulatus* a sobrevivência após 12 horas de anoxia foi alta, cerca de 80% dos animais (Oliveira e cols., 2000). Nesta mesma espécie, Gonçalves (1993) observou um tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) de 19h:45 min. em animais submetidos por 30 horas à anoxia ambiental.

Ao longo dos últimos anos, os estudos sobre o metabolismo intermediário e sua regulação, em invertebrados aquáticos, vêm contribuindo para o conhecimento dos processos evolutivos e adaptativos desses organismos ao seu meio (Kucharski e Da Silva, 1991, 1991b; Vinagre e Da Silva, 1991, 1992; Oliveira e Da Silva, 1997, 2001, 2003; Marqueze, 2005).

O caranguejo *Chasmagnathus granulatus* tem se mostrado um excelente modelo biológico para o estudo do metabolismo intermediário em invertebrados, por ser animal estuarino e devido a sua excelente adaptação às condições de laboratório. Trabalhos experimentais envolvendo fatores abióticos, como alterações nos níveis de oxigênio dissolvido na água (Oliveira 1998), o estresse hiposmótico ou hiperosmótico (Kucharski e Da Silva, 1992; Oliveira e cols., 2000, 2004), evidenciaram a participação da glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese e glicólise bem como as alterações na atividade e na expressão das enzimas PEPCK, glicogênio sintase, glicogênio fosforilase e piruvato quinase em diferentes tecidos de *C. granulatus* durante os processos de aclimação às condições experimentais.

Em seu habitat o *C. granulatus* enfrenta o desafio de hipóxia/anoxia/recuperação constantemente. Estudos sobre a utilização da

glicose, principal substrato energético em crustáceos, pelos tecidos hepatopancreático e muscular de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* submetidos a um período curto de anoxia e recuperação, fornecerão informações sobre os ajustes metabólicos envolvidos na aclimação deste caranguejo ao meio anóxico e como as reservas energéticas são restauradas, no período de recuperação pós-anoxia, quando ocorre uma re-oxigenação tecidual.

## OBJETIVOS

Avaliar o efeito de uma hora de anoxia e três horas da fase de recuperação da anoxia sobre a captação de 2-Deoxi<sup>14</sup>C-glicose, a síntese e a mobilização de glicogênio, a síntese de lipídios e a produção <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> a partir de <sup>14</sup>C-glicose no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* alimentados com uma dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta dos animais**

Os animais foram coletados na lagoa Tramandaí (29°58'S; 58°08'W), no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, apenas durante os meses de verão. Foram coletados somente animais machos durante o estágio C de intermuda de acordo com os critérios morfológicos descritos por Drach and Tchernigovtzeff (1967), para minimizar os efeitos fisiológicos do ciclo reprodutivo e dos períodos de muda.

Os animais foram trazidos ao laboratório em caixas plásticas com água do próprio local. No laboratório receberam um choque hiposmótico durante 24 horas para retirada de parasitas e esvaziamento do conteúdo estomacal.

### **Tratamento dos animais**

Após este período, os animais foram separados em dois grupos: 1) animais que receberam uma dieta rica em carboidratos (arroz cozido, HC) (Tabela 1); 2) animais que receberam uma dieta rica em proteínas (carne bovina crua, HP) (Tabela 1) A dieta HC possui aproximadamente o mesmo valor calórico da dieta HP, sendo então consideradas dietas isocalóricas. Os conteúdos de proteínas e carboidratos dos constituintes alimentares das respectivas dietas foram determinados pelo Instituto de Tecnologia e Alimento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Os dois grupos receberam diariamente alimento, *ad libitum*, durante quinze dias.

Os animais foram aclimatados durante 15 dias em aquários com aeração constante, PO<sub>2</sub> 18,95%, salinidade 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, temperatura de 25°C e fotoperíodo natural, onde receberam as respectivas dietas.

### Valores calóricos de cada dieta

Tabela 1. Os valores relativos a cada item estão expressos em percentuais e os valores calóricos totais estão expressos em cal/100g.

	<b>Dieta HC</b>	<b>Dieta HP</b>
<b>Proteínas</b>	3,34	21,59
<b>Gorduras</b>	0,45	6,71
<b>Fibras</b>	0,30	0,31
<b>Umidade</b>	61,33	71,01
<b>Cinzas</b>	0,02	0,35
<b>Carboidrato</b>	34,56	0,03
<b>Valor Calórico Total</b>	155,65	146,87

### Procedimento experimental

Para os estudos de anoxia, foram utilizados em média 15 animais ( em média 5 animais para cada grupo, por exemplo, 5 para controle, 5 para anoxia e cinco recuperação, que recebem dietas HC ou HP). Estes animais foram divididos em três grupos, com cinco animais em cada grupo: controle, anoxia e recuperação. Os três grupos foram mantidos em aquários de vidro (30x25x30 cm), com salinidade de 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub> e temperatura de 25°C. O teor de O<sub>2</sub> nos aquários do grupo anoxia foi substituído por gás N<sub>2</sub> durante 40 minutos, até que a concentração de oxigênio

chegasse ao valor de zero (monitorada com Oxímetro Oxel-1/ISO<sub>2</sub>, World Precision Instruments). Os aquários foram então lacrados e os animais, submetidos à anoxia durante uma hora, para depois serem utilizados nos experimentos.

O grupo controle foi mantido em normóxia ( $PO_2$  18,95%), com salinidade 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub> e temperatura de 25 °C.

Para os experimentos de recuperação, os animais foram mantidos sob as mesmas condições do grupo anoxia por uma hora. Após este período, a água desoxigenada foi substituída por água com teor de oxigênio de 18,95%, mesma concentração do grupo normóxia, onde permaneceram por três horas.

Amostras de hemolinfa (100uL mais 20uL Oxalato de Potássio 10%) foram coletadas dos animais dos grupos normóxia, anoxia e recuperação e congeladas a -20<sup>0</sup>C pra dosagens de glicose; após os animais foram crioanestesiados durante cinco minutos e os tecidos coletados e imediatamente utilizados nos experimentos.

## **PROCEDIMENTOS IN VITRO**

Para os experimentos *in vitro*, o hepatopâncreas e o músculo da mandíbula (de todos os grupos experimentais, normóxia, anoxia e recuperação, HP e HC) foram rapidamente removidos e colocados em placas de Petri sobre gelo, contendo meio de incubação gelado específico para *C. granulatus* (481 mM NaCl, 12,2 mM KCl, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 93 mM MgCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 31 mM NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, 278 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 8,8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, mais 10 mM HEPES e 0,1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF), pH 7,8). Os tecidos foram fatiados em frações de 50 ± 2 mg.

### **Captação de Glicose**

As amostras de tecido (cerca de 50 mg) foram colocadas em tubos de 2 mL com tampa, contendo 0,5mL de meio de incubação, 0,2  $\mu$ Ci 2-Deoxi<sup>14</sup>Cglicose (2DG) (230 mCi mmol, Amersham International), aerados com uma mistura de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (95:5%, v/v) por 30 segundos e incubados sob agitação constante por 1 hora a 25°C. Após o período de incubação, a reação foi interrompida em banho de gelo, as amostras de tecido retiradas do meio de incubação e lavadas 3 vezes em meio de incubação sem radiativo, secas em papel de filtro e colocadas em tubos pirex com tampa, contendo 1 mL de água bi-destilada. Os tubos foram congelados a -20°C e depois fervidos por 30 minutos. Este procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas, com o objetivo de romper as células e liberar a radioatividade captada; este meio foi considerado o meio interno. O meio de incubação contendo a glicose marcada foi considerado como o meio externo.

Amostras de 100uL do meio interno ou externo foram dissolvidas em 5 mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton (2:1, v/v), PPO 0,4%-POPOP 0,01%), juntamente com 100uL de água destilada. A radioatividade foi medida em um contador LKB-Wallac.

Os resultados foram expressos como relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T / M: dpm/mL meio interno dividido dpm/mL do meio de incubação).

## **Síntese e Mobilização de Glicogênio**

Para a síntese de glicogênio, as amostras de tecido (cerca de 50 mg) foram colocadas em tubos com tampa de 2 mL, contendo 0,5mL de meio de incubação, 0,2  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]glicose (230 mCi mmol, Amersham International) mais 10mM D-glicose, aerados com uma mistura de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5%, v/v) por 30 segundos e incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante por 2 horas a 25°C. Após o período de incubação, uma parte das amostras era processada para a síntese de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio (tempo zero) e a outra parte era utilizada para o estudo de mobilização do glicogênio pré-marcado. Os tecidos com  $^{14}\text{C}$ -glicogênio (pré-marcado), que seriam utilizados no estudo de mobilização, eram lavados por três vezes em meio de incubação gelado sem radioativo ou glicose, secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 500 $\mu\text{L}$  de meio de incubação sem glicose (não marcada ou marcada), sendo aerados com uma mistura de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5%, v/v) por 30 segundos e incubados em banho metabólico, sob as mesmas condições acima descritas, por 1 hora.

Para a determinação do  $^{14}\text{C}$ -glicogênio, tanto nos experimentos de síntese como naqueles de mobilização, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, os tecidos lavados por três vezes em meio de incubação gelado sem glicose, secos em papel filtro, colocados em KOH (0,5N) e fervidos (80°C) durante uma hora para a digestão do tecido. Para a desproteíntização e neutralização, uma amostra da solução resultante da digestão do tecido foi misturada a uma solução de TCA (30%) mais ácido clorídrico (1N), em uma proporção de 2:1 (v/v) e centrifugada por 10min. a 10000rpm. Um volume de 30 $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi aplicado sobre

papel Wattman 3MM (2 cm x 2 cm). Para a precipitação do  $^{14}\text{C}$ -glicogênio, os filtros foram lavados por 2 vezes em álcool etílico (66%), a primeira por 30 minutos e a segunda por 15 minutos e após secos à temperatura ambiente (Oliveira e cols., 2001). Como branco usava-se o mesmo tipo de papel de filtro, que sofria o mesmo procedimento, mas sem a amostra de tecido. Quando secos, os filtros eram colocados em 5 mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton (2:1, v/v), PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade era medida em um aparelho LKB-Wallack. Os resultados foram expressos em nmol de  $^{14}\text{C}$ -glicose convertido em glicogênio por grama de proteína por hora de incubação.

### **Síntese de lipídeos**

Para a síntese de lipídios, as amostras de tecido (cerca de 50 mg) foram colocadas em tubos com tampa de 2 mL, contendo 0,5mL de meio de incubação, 0,2  $\mu\text{Ci}$  [U- $^{14}\text{C}$ ]glicose (230 mCi mmol, Amersham International) mais 10mM D-glicose, aerados com uma mistura de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5%, v/v) por 30 segundos e incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante por 1 hora a 25°C. Após a incubação, a reação foi interrompida em banho de gelo, os tecidos retirados do meio de incubação e lavados 3 vezes em meio de incubação sem radiativo ou glicose e homogeneizados em uma mistura de extração de clorofórmio:metanol (2:1, v/v).

A extração dos  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais foi realizada segundo o método de Folch e cols. (1957). Após, amostras (2mL) da fase clorofórmica de extração eram colocadas em frascos, utilizados para a medida da radioatividade, que eram mantidos descobertos por uma noite a temperatura ambiente dentro de uma capela de

exaustão, para a evaporação do clorofórmio. Após as amostras eram dissolvidas em líquido de cintilação (Tolueno-Triton (2:1, v/v), PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade medida em um aparelho LKB-Wallac Os resultados são expressos em umol de  $^{14}\text{C}$ -glicose incorporadas em lipídios totais por grama de proteína por hora de incubação.

### **Formação de $^{14}\text{CO}_2$**

Para a determinação da produção de  $^{14}\text{CO}_2$ , segundo a técnica descrita por De Oliveira e cols. (2002), amostras (cerca de 50 mg) de hepatopâncreas ou músculo mandibular foram colocadas em frascos de vidro com tampa de borracha, onde era inserido um poço de vidro contendo papel Whatman 3MM para a captação do  $^{14}\text{CO}_2$  resultante da oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose. Aos frascos eram adicionados 1mL de meio de incubação e 0,2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ]-glicose (230 mCi mmol, Amersham International) mais 10 mM glicose, após eram aerados com uma mistura de  $\text{O}_2:\text{CO}_2$  (95:5%, v/v) por 30 segundos, selados e incubados em banho metabólico (Dubnoff) sob agitação constante por 1 hora a 25°C.

A reação de oxidação foi interrompida após a injeção, através da tampa de borracha, de 0,25 mL de TCA 50% no meio de incubação e 0,25 mL de NaOH 2M nos poços de captação do  $^{14}\text{CO}_2$ . Os frascos vedados eram deixados em repouso por uma noite. Após eram acrescentadas 5 gotas de metanol aos poços e todo o pocinho era colocado em 10 mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton (2:1, v/v), PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade medida em um aparelho LKB-Wallac Os resultados

foram expressos em nmol de  $^{14}\text{C}$ -glicose convertida em  $^{14}\text{CO}_2$  por g de tecido por hora de incubação.

## **DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**

### **Proteínas teciduais**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão. Os resultados foram expressos em mg de proteína.

### **Glicose da hemolinfa**

A glicose hemolinfática foi determinada pelo método colorimétrico enzimático da glicose-oxidase, com o kit Glicose Enzi-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). Os resultados foram expressos em mmol/L.

### **Análise estatística**

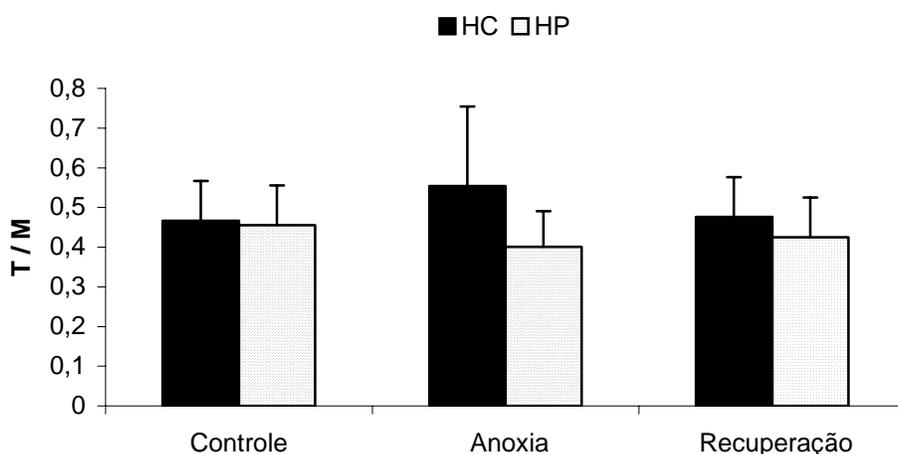
Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (SDM). ANOVA de uma via foi utilizada para a comparação entre os grupos controle, anoxia e recuperação. O teste t de Student foi utilizado para a comparação entre os grupos HP e HC e os valores com  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Foi utilizado o programa SPSS para Windows 1.0.

## RESULTADOS

### Captação de Glicose

Os valores de captação de glicose no músculo de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 1. Os resultados foram expressos como relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T / M: dpm/mL meio interno dividido dpm/mL do meio de incubação).

Não foram encontradas diferenças significativas de captação de glicose entre as dietas HP e HC (controles). Nos grupos HP e HC não foram verificadas diferenças significativas da relação T/M entre os três grupos experimentais controle, anoxia e recuperação.



**Figura 1: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a captação de glicose no músculo de *C. granulatus*.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões.

Os valores de captação de glicose no hepatopâncreas de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 2. Os resultados foram expressos como relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T / M: dpm/mL meio interno dividido dpm/mL do meio de incubação).

Não foi constatada diferença significativa na captação da 2DG entre os caranguejos alimentados com a dieta HP e aqueles mantidos com a HC. No grupo que recebeu a dieta HC, não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os valores de captação da 2DG dos grupos recuperação e anoxia. Também nos animais alimentados com a dieta HP não foi verificada diferença significativa na captação de glicose entre os três tratamentos experimentais.

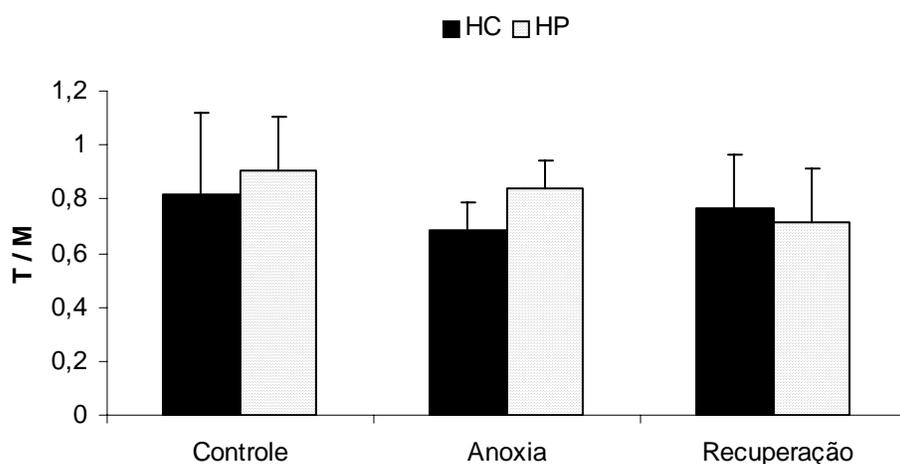
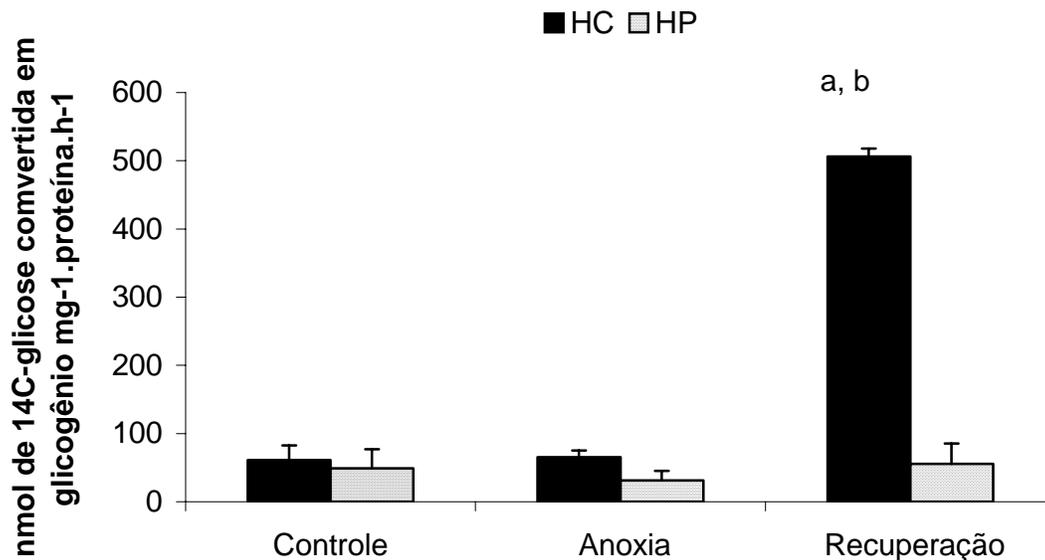


Figura 2: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a captação de glicose no hepatopâncreas de *C. granulatus*.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões.

## Síntese de Glicogênio

Os valores de síntese de glicogênio no músculo de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 3. Não foi constatada diferença significativa de síntese de glicogênio no músculo entre caranguejos alimentados com a dieta HC e HP e mantidos em normóxia. Nos animais que receberam a dieta HC, a anoxia não alterou significativamente a síntese de glicogênio no músculo. Entretanto, a recuperação aumentou 4 vezes ( $p < 0,05$ ) a síntese de glicogênio no músculo da mandíbula quando comparada àquelas nos grupos controle e anoxia. Este aumento também foi significativo ( $p < 0,05$ ) em relação ao mesmo grupo recuperação, que recebeu a dieta HP. Nos caranguejos alimentados com a dieta HP não foram constatadas diferenças significativas de síntese de glicogênio no músculo entre os grupos controle, anoxia e recuperação.



**Figura 3: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a síntese de glicogênio no músculo de *C. granulatus*.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta HP.

Os valores de síntese de glicogênio em hepatopâncreas de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 4. Não foi constatada diferença significativa de síntese de glicogênio no hepatopâncreas entre caranguejos alimentados com a dieta HC e HP. Após 1h de anoxia os valores de síntese de glicogênio do grupo HP não apresentaram alterações significativas ( $p > 0,05$ ). Durante a fase de recuperação a capacidade de síntese de glicogênio no hepatopâncreas do grupo HP aumentou cerca de 8 e 5 vezes quando comparada àquelas dos grupos controle e anoxia, respectivamente. Este aumento também foi significativo quando comparado aquele observado no grupo recuperação alimentado com a dieta HC.

No grupo que recebeu a dieta HC foi constatado um aumento de 3 vezes na capacidade de síntese de glicogênio após 1 h em anoxia, contudo, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Durante a fase de recuperação, os valores de síntese de glicogênio no hepatopâncreas diminuíram cerca de 60% e 80% em relação aos grupos controle e anoxia, respectivamente. Contudo, estas diferenças não foram significativas ( $p > 0,05$ ).

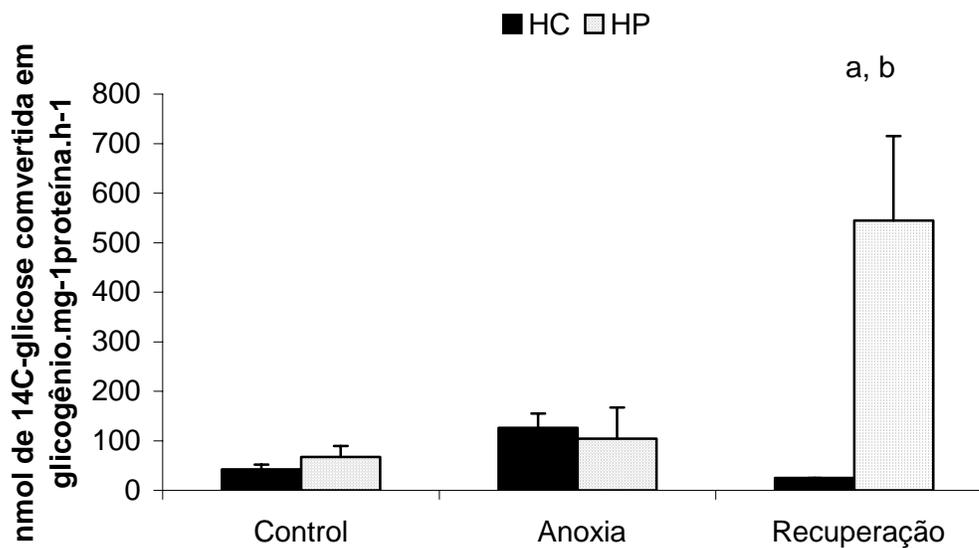


Figura 4: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a síntese de glicogênio no hepatopâncreas de *C. granulatus*.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta HP.

## Mobilização de glicogênio

Os valores de mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no músculo de *C. granulatus* alimentados com dieta HC podem ser vistos na figura 5. Não foram verificadas diferenças significativas de mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio entre os animais do grupo controle. Quando os animais são submetidos a 1h de anoxia, a mobilização de glicogênio diminui em relação ao grupo normóxia e ao grupo pré marcado. Após 3 horas em recuperação aumenta a síntese de glicogênio em comparação aos grupos controle e anoxia, contudo, uma mobilização significativa ( $p < 0,05$ ) de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio foi observada após a incubação por 1h em meio livre de glicose. Os valores de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no músculo do grupo recuperação retornam a valores semelhantes aqueles do grupo controle.

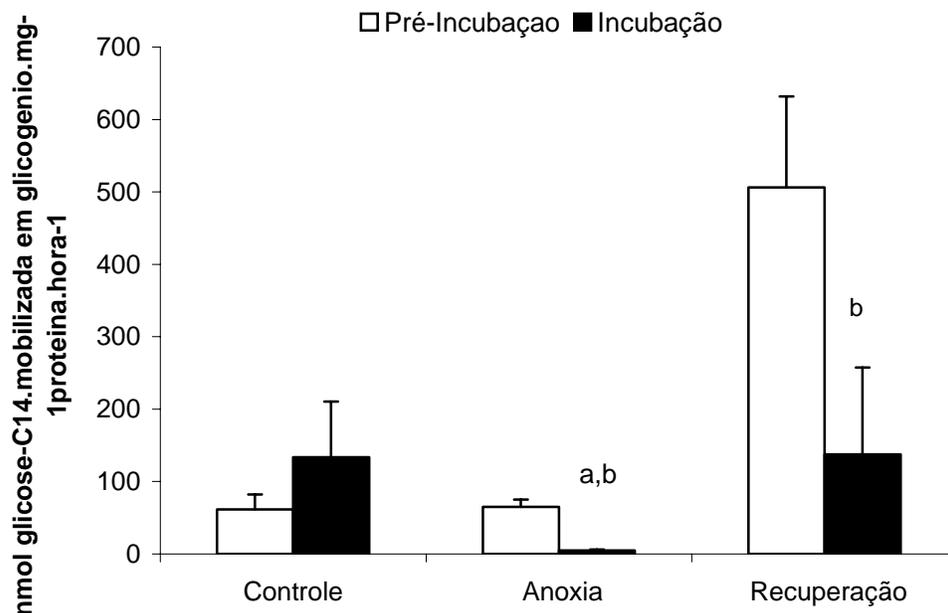


Figura 5: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio no músculo de *C. granulatus* alimentados com dieta HC.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo não incubado.

Os valores de mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no músculo de *C. granulatus* alimentados com uma dieta HP podem ser vistos na figura 6. No grupo normoxia não foi verificada diferença significativa entre os grupos controle pré-incubação e incubação. A anoxia por 1h não alterou significativamente ( $p > 0,05$ ) a mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio neste tecido. Contudo, a recuperação por 3h aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) a mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no músculo dos grupo incubação quando comparado ao grupo normoxia e ao grupo pré incubado.

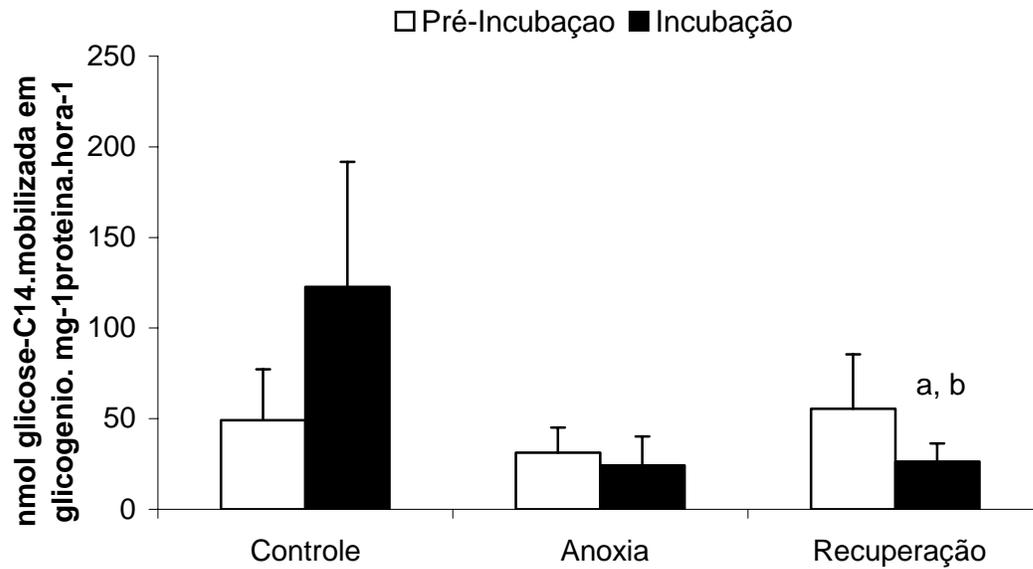


Figura 6: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio no músculo de *C. granulatus* alimentados com dieta HP. Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo não incubado.

Os valores de mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no hepatopâncreas de *C. granulatus* alimentados com dieta HC podem ser vistos na figura 7. Não foi verificada diferença significativa nos valores de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio entre os grupos normóxia pré-incubação e pós-incubação em meio livre de glicose. A anoxia estimulou significativamente ( $p < 0,05$ ) a síntese de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no hepatopâncreas do grupo não incubado. A recuperação por 3h não estimulou significativamente ( $p > 0,05$ ) a mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no hepatopâncreas dos caranguejos do grupo incubação.

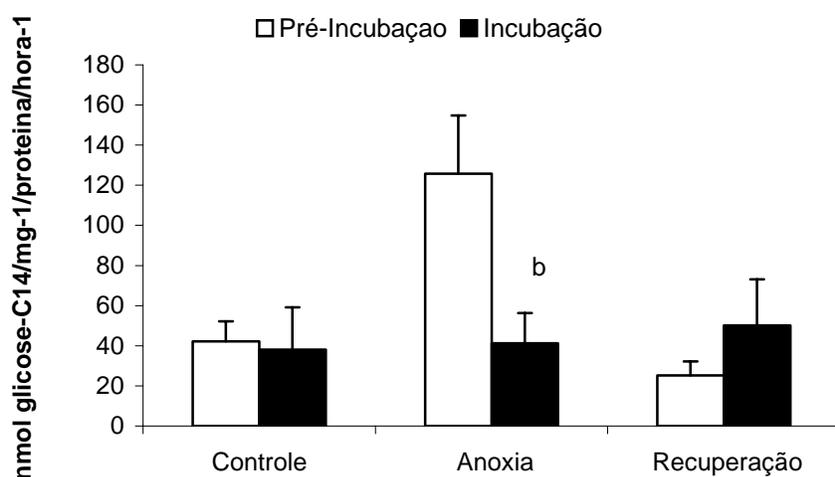


Figura 7: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio no hepatopâncreas de *C. granulatus* alimentados com dieta HC.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo não incubado.

Os valores de mobilização de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no hepatopâncreas de *C. granulatus* alimentados com dieta HP podem ser vistos na figura 8. No hepatopâncreas dos animais controle, alimentados com a dieta HP, não foi verificada variação significativa ( $p>0,05$ ) da síntese de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio entre o grupo pré-incubação e incubação em meio livre de glicose. A anoxia por 1h e a recuperação por 3h diminuíram em cerca de 50% e 90%, respectivamente, o  $^{14}\text{C}$ -glicogênio pré-marcado após 1h de incubação em meio livre de glicose.

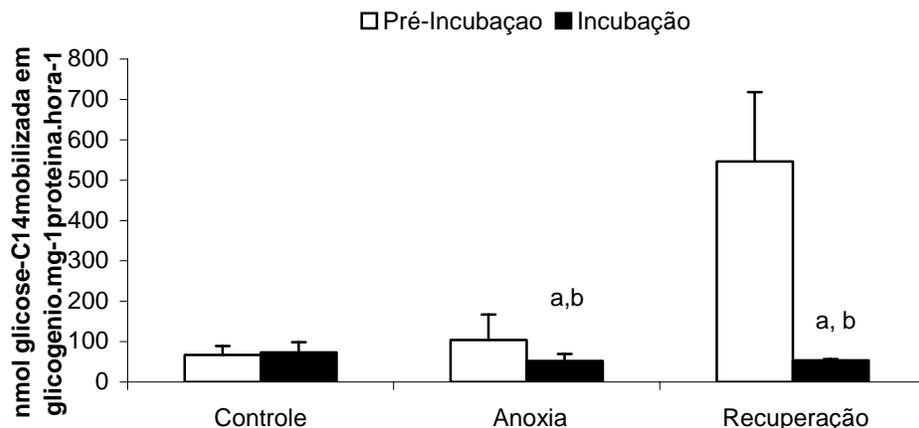


Figura 8: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio no hepatopâncreas de *C. granulatus* alimentados com dieta HP.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo não incubado.

## Síntese de lipídeos a partir de $^{14}\text{C}$ glicose

Os valores de síntese de lipídeos a partir de  $^{14}\text{C}$  glicose no músculo de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 9. Em normóxia, os valores de síntese de lipídios totais a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose foram 7 vezes maiores no músculo dos animais alimentados com a dieta HP quando comparados aqueles obtidos no grupo mantido com a dieta HC. No músculo dos animais alimentados com a dieta HC nem a anoxia, nem a fase de recuperação de 3h alteraram significativamente ( $p > 0,05$ ) os valores de formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais. Entretanto, nos caranguejos mantidos com a dieta HP a anoxia por 1h diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) os valores de síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose. Os valores de incorporação do  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo do grupo HP mantêm-se baixos após 3h de recuperação em normóxia.

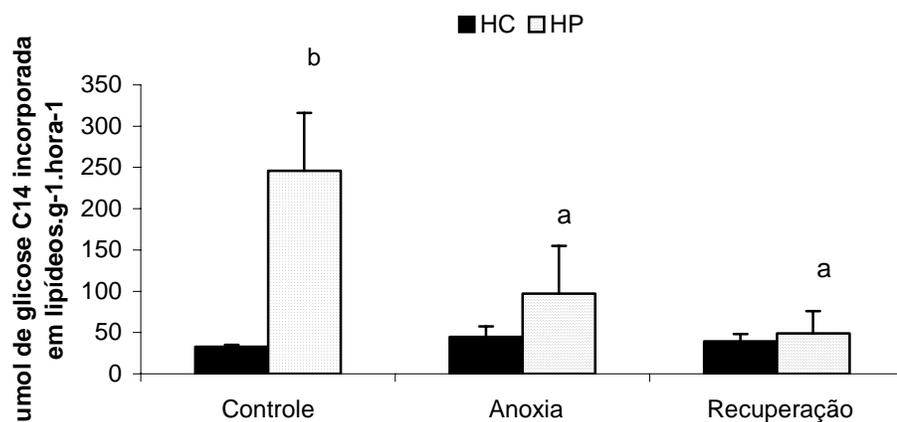


Figura 9: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a síntese de lipídios no músculo de *C. granulatus***. Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta HP.

Os valores de síntese de lipídeos a partir de  $^{14}\text{C}$  glicose no hepatopâncreas de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 10. Não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) de síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais entre os controles alimentados com a dieta HC e aqueles mantidos com a HP. Nos caranguejos alimentados com a dieta HC, não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) de síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios entre os grupos normóxia, anoxia e recuperação. Os animais do grupo HP, que foram submetidos a anoxia, apresentam valores de síntese de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aqueles verificados no grupo normóxia. Esta diferença também foi significativa em relação ao grupo anoxia dos caranguejos mantidos com a dieta HC. Na fase de recuperação a incorporação do  $^{14}\text{C}$ -glicose em lipídios totais no hepatopâncreas dos caranguejos alimentados com a dieta HP diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo anoxia e normóxia

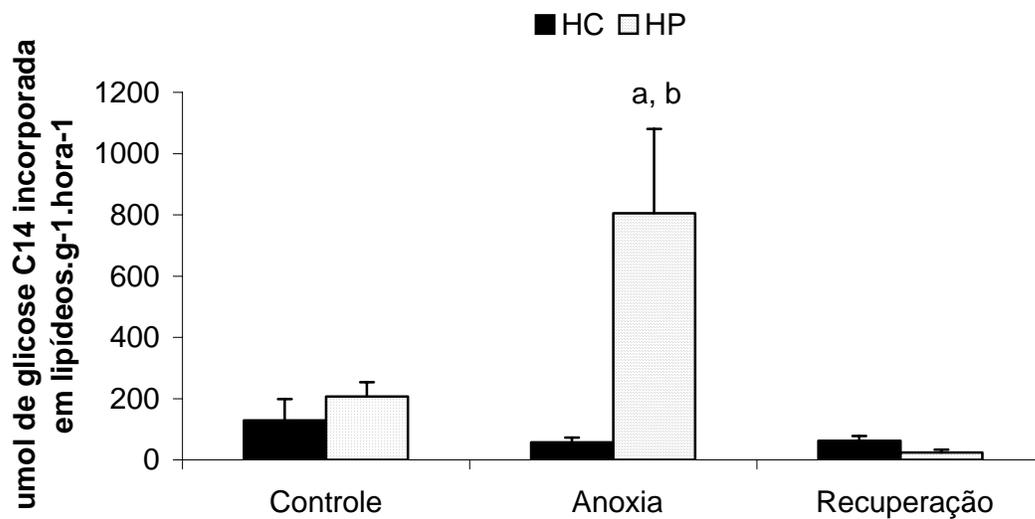


Figura 10: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a síntese de lipídios em hepatopâncreas de *C. granulatus*.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta HP.

## Formação de $^{14}\text{CO}_2$

Os valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo da mandíbula de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 11. O grupo controle mantido com a dieta HP apresentou valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  2,3 vezes maiores ( $p < 0,05$ ) do que aqueles constatados no grupo HC. No músculo dos animais mantidos com a dieta HC, não foram encontradas diferenças significativas de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  entre os três grupos (controle, anoxia e recuperação). A anoxia diminuiu cerca de 59% a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  no grupo HP. Três horas de recuperação não foram suficientes para o retorno a valores de  $^{14}\text{CO}_2$  semelhantes daqueles do controle mantido com a dieta HP.

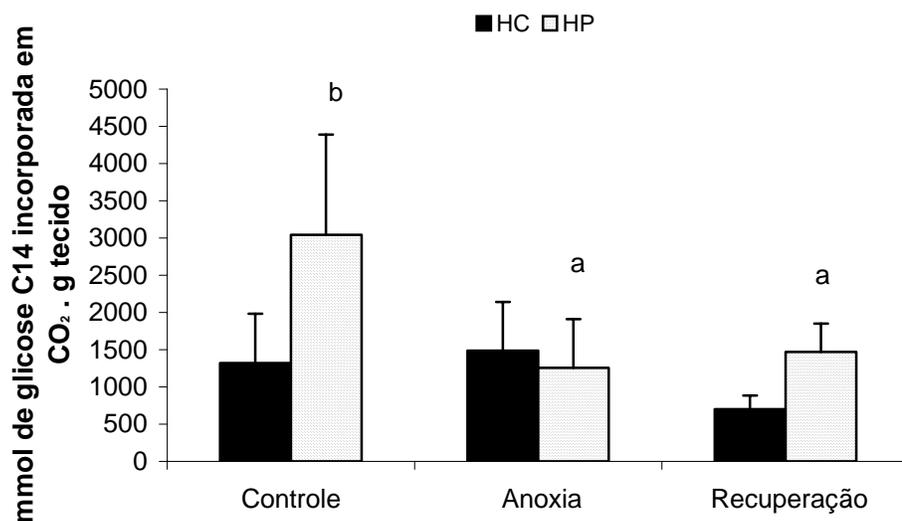


Figura 11: **Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose no músculo de *C. granulatus*.** Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta HP.

Os valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  no hepatopâncreas de *C. granulatus* podem ser vistos na figura 12. O grupo HC apresentou valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  no hepatopâncreas 2 vezes menores que aqueles verificados no grupo HP. A anoxia e a fase de recuperação não alteraram significativamente ( $p > 0,05$ ) os valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose no grupo HC. Nos animais do grupo HP a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose no hepatopâncreas aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) durante a anoxia. A recuperação por 3h foi suficiente para o retorno a valores de  $^{14}\text{CO}_2$  semelhantes daqueles do controle mantido com a dieta HP. Esta diferença também foi significativa em relação ao grupo HC recuperação.

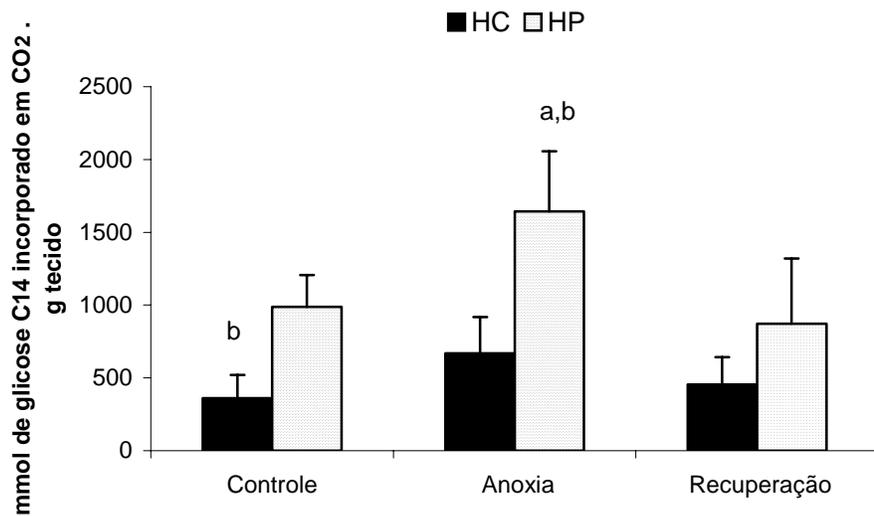


Figura 12: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose em hepatopâncreas de *C. granulatus*. Os valores representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. “a” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação à dieta HP.

## **Concentrações de glicose na hemolinfa e de glicogênio nos tecidos**

Os resultados das concentrações de glicose na durante a anoxia e a fase de recuperação, em caranguejos alimentados com uma dieta HC ou HP, podem ser vistos na tabela 2.

A concentração de glicose na hemolinfa dos caranguejos alimentados com a dieta HC foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior no grupo HC do que a dos animais mantidos com a dieta HP. A anoxia por 1h elevou em 6 vezes ( $p < 0,05$ ) a concentração de glicose hemolinfática tanto nos animais alimentados com a dieta HC como naqueles mantidos com a dieta HP. A comparação dos valores de glicose na hemolinfa, durante a anoxia, mostra que, no grupo HC, os níveis de glicose continuam significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores do que aqueles verificados nos caranguejos do grupo HP.

Durante a fase de recuperação os níveis de glicose hemolinfática no grupo HP diminuem ( $p < 0,05$ ) atingindo valores semelhantes aos do grupo normóxia. Contudo, no grupo alimentado com a dieta HC apesar da redução nos níveis de glicose durante a fase de recuperação, os valores ainda são significativamente ( $P < 0,05$ ) mais elevados quando comparados aqueles do grupo normóxia.

**Tabela 2** – Concentração de glicose na hemolinfa de *C. granulatus* alimentados com dieta HC ou HP e submetidos a anoxia e a recuperação da anoxia.

Glicemia mmol/L		
	HC	HP
Controle	2,18±1,2 (7)	1,16± 0,4 (8)
Anoxia	12,6 ± 2,1 (5) a, b	7,43 ± 3,6 (8) a
Recuperação	6,38 ± 2,2 (8) a, b	1,35± 0,7 (10)

Os valores são expressos em médias ± desvio padrão. “a” indica diferença significativa ( $P < 0.05$ ) em relação ao grupo controle. “b” significa diferença significativa em relação à outra dieta. O número de animais utilizado em cada experimento está entre parênteses.

## Discussão

Os efeitos metabólicos da anoxia e da subsequente recuperação sobre o metabolismo da glicose no músculo e no hepatopâncreas de *C. granulatus* foram marcantes em relação ao grupo em normóxia.

A anoxia e a recuperação fazem parte do ciclo natural de vida do caranguejo *C. granulatus*. Esta espécie em incursões terrestre em busca de alimento ou quando permanece em suas tocas por longos períodos, como no inverno, é submetida à hipóxia ou anoxia ambiental, intercalada por períodos de recuperação na água (D’Incao e cols, 1990; Turcato, 1990). Em caranguejos alimentados com a dieta HC ou HP, a sobrevivência à anoxia ambiental é alta, cerca de 80% após 12h (Oliveira, 1998).

Nos animais em normóxia alimentados com a dieta HC a captação de glicose, a síntese e a mobilização de glicogênio são semelhantes às aquelas verificadas nos caranguejos mantidos com a dieta HP, apesar dos valores elevados de glicogênio no músculo e no hepatopâncreas e de glicose na hemolinfa. Entretanto, a conversão de  $^{14}\text{C}$ -glicose em  $^{14}\text{CO}_2$  no músculo e no hepatopâncreas é marcadamente mais elevada no grupo controle HP, quando comparada ao grupo HC. A constatação de valores de ATP, no músculo e no hepatopâncreas de caranguejos do grupo HP em normóxia, foram significativamente menores daqueles verificados no grupo HC (Marqueze, 2005; Marqueze e cols., 2006), e isso corrobora com a hipótese que em animais alimentados com a dieta rica em proteínas a oxidação de glicose no músculo e no hepatopâncreas seria maior que

no grupo HC, talvez para compensar as reservas de carboidratos bastante reduzidas nestes caranguejos (Kucharski e Da Silva, 1991).

No presente trabalho, a significativa capacidade de síntese de lipídios a partir de glicose, verificada no músculo nos caranguejos do grupo controle HP, confirma os dados de Kucharski e Da Silva (1991) que constataram que a concentração de lipídios totais no músculo de *C. granulatus* mantidos com a dieta rica em proteínas era semelhante àquela verificada no grupo HC. Contudo, no grupo HP a concentração de glicogênio muscular é marcadamente menor do que aquela constatada no músculo do grupo HC (Marqueze e cols., 2006), sugerindo que a glicose no músculo do grupo HP seria desviada para a síntese de lipídios e oxidação. Esta hipótese seria confirmada, em parte, pela constatação que o músculo dos caranguejos dos grupos HP apresenta capacidade de síntese de glicogênio a partir de glicose similar àquela verificada no músculo do grupo HC. Kucharski e Da Silva (1991) sugerem que os lipídios do músculo seriam uma importante fonte de reserva energética durante os meses de inverno, quando o *C. granulatus* permanece em sua toca por longos períodos e praticamente em jejum. Já os lipídios do hepatopâncreas seriam fonte de energia utilizada durante o período reprodutivo deste caranguejo (Kucharski e Da Silva, 1991), o que explicaria a similar capacidade de síntese de lipídios verificada neste órgão nos grupos controle HC e HP constatada no presente estudo.

Os resultados demonstram que 1 hora de anoxia não reduziu a captação de glicose e a síntese de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo de *C. granulatus* tanto em animais alimentados com a dieta HP como naqueles mantidos com a dieta HC. Oliveira e cols. (2001), estudando o efeito de diferentes tempos de

anoxia em *C. granulatus* mantidos com dieta HC ou HP, verificaram que a redução na capacidade de síntese de glicogênio só ocorreu após 2 horas em anoxia em ambos grupos. Os resultados sugerem que após 1 h em anoxia o *C. granulatus* ainda não está em depressão metabólica. No músculo e no hepatopâncreas desta espécie foi verificada ativação da via glicolítica na primeira hora de anoxia, tanto em caranguejos alimentado com a dieta HP como naqueles mantidos com a dieta HC, contudo, após duas horas em anoxia ocorre uma diminuição na atividade da via glicolítica muscular (Marqueze, 2004; Marqueze e cols, 2006). Também a anoxia por 1 h não alterou de forma significativa a captação de glicose no hepatopâncreas e no músculo de caranguejos alimentados com a dieta HP ou HC, explicando assim a manutenção da capacidade de síntese de glicogênio e a atividade glicolítica (Marqueze, 2004; Marqueze e cols., 2006) e os valores de glicose hemolinfática mais moderados do que aqueles obtidos por Oliveira e cols. (2001) em *C. granulatus* após 4 horas de anoxia. Oliveira e cols. (2001) também verificaram que no hepatopâncreas desta mesma espécie a redução na captação de glicose só ocorreu após 4 horas de anoxia. Segundo Santos e cols. (1987), seria após 2 h de exposição à hipóxia que ocorreria uma redução do consumo de O<sub>2</sub> e da atividade locomotora em *C. granulatus*, o que caracterizaria o início da depressão metabólica.

O período de anoxia de 1 h aumentou a mobilização de <sup>14</sup>C-glicogênio no músculo e no hepatopâncreas e a concentração de glicose na hemolinfa em animais alimentados com a dieta HP ou HC. Estes dados são consistentes com achados prévios que demonstraram que 1 h de anoxia diminuía significativamente a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo de *C. granulatus*

(Marqueze, 2004; Marqueze e cols., 2006), demonstrando que como outros crustáceos este caranguejo utiliza a fermentação do glicogênio para a obtenção de ATP (Hervant e cols., 1999 a, b).

A anoxia por 1 h diminuiu marcadamente a capacidade de síntese de lipídios a partir de glicose no músculo dos animais alimentados com a dieta HP. Estudos prévios demonstram que na primeira hora de anoxia a via glicolítica está ativada nesse tecido de animais alimentados com a dieta HP (Marqueze e cols., 2006). Contudo, no músculo do grupo HP a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose diminuiu significativamente durante a anoxia, mas a concentração de ATP muscular aumenta de forma significativa (Marqueze e cols., 2006), explicando a redução na síntese de lipídios nesse tecido após 1 h de anoxia. Entretanto, nesse mesmo grupo experimental (HP), o aumento na formação de  $^{14}\text{C}$ -lipídios totais no hepatopâncreas foi significativo após 1 h de anoxia. No hepatopâncreas desses caranguejos a via glicolítica também está ativada e as reservas de ATP e glicogênio diminuídas (Marqueze, 2005), mas nossos resultados demonstram que a oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose a  $^{14}\text{CO}_2$  aumenta 75%. Esses dados indicam que ao contrário do que ocorre no músculo o hepatopâncreas do grupo HP utilizaria parte da glicose para a síntese de substrato energético como os lipídios, cabe lembrar que no período de 1 h ainda não se instalou nesses animais a depressão metabólica. Esta estratégia pode ser explicada pelo fato que durante a anoxia os organismos precisam aumentar a produção de energia em um primeiro momento e após diminuir a atividade dos processos que consomem energia (Lutz e Nilsson, 1997; Nilsson, 2001). Assim, no primeiro momento o animal aumentaria as

reservas de lipídios para serem usadas posteriormente caso a anoxia prosseguir por mais tempo.

Nos animais alimentados com a dieta HC a anoxia por 1 h não alterou de forma significativa a síntese de lipídios e a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -glicose, nesses caranguejos a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo e a capacidade glicolítica em normóxia estão significativamente mais alta que nos caranguejos mantidos com a dieta HP, sugerindo que a composição da dieta afeta de forma marcante a resposta à anoxia nesses crustáceos.

Após a anoxia, o período de recuperação é de extrema importância, visto que é durante este período que ocorre a reposição das reservas energéticas e os produtos finais acumulados durante o período de anaerobiose são removidos do organismo. Em *C. granulatus*, processos endergônicos de síntese são ativados durante este período de recuperação e os valores de síntese de glicogênio no músculo do grupo HP e no hepatopâncreas do grupo HC ultrapassam aqueles dos respectivos grupos controle, explicando, em parte, a diminuição dos valores de glicose na hemolinfa durante o período de recuperação. Também não foi verificada alteração significativa na captação de glicose em todos os grupos estudados e nos dois tecidos. O aumento da capacidade de síntese e a diminuição na mobilização de glicogênio aumentaram a concentração de glicogênio no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HC.

No período de recuperação, os animais retomam sua atividade locomotora e aumentam os gastos energéticos, o que explica a manutenção da capacidade de mobilização de glicogênio no músculo dos grupos HP e HC e no hepatopâncreas do grupo HP constatada no presente estudo. Conseqüentemente, nesses

caranguejos 3 h de recuperação não foram suficientes para restabelecer os valores de glicogênio nesses tecidos (Marqueze, 2005; Marqueze e cols., 2006). Contudo, no músculo dos animais HC, onde a capacidade de síntese está ativada, Marqueze e cols. (2006) verificaram, após 3 h de recuperação, valores de glicogênio significativamente maiores do que aqueles verificados no grupo anoxia.

No músculo dos animais mantidos com a dieta HP, a concentração de glicogênio após 3 h de recuperação da anoxia está significativamente menor do que aquela verificada no grupo controle (Marqueze e cols., 2006); o que explicaria as reduzidas capacidades de síntese de lipídios e de oxidação de  $^{14}\text{C}$ -glicose constatadas nesse grupo no presente trabalho. Já no hepatopâncreas do grupo HP a síntese de lipídios e a oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose retornaram a valores semelhantes aqueles do grupo em anoxia. Nos tecidos estudados dos animais do grupo HC, 3 h de recuperação após anoxia não estimularam a capacidade de síntese de lipídios nem a oxidação da  $^{14}\text{C}$ -glicose, os valores permanecem semelhantes àqueles verificados nos grupos controle e anoxia. Esta resposta diferenciada do grupo HC pode ser explicada pela manutenção durante a anoxia de elevada concentração de glicogênio nos tecidos, que seria uma estratégia utilizada pelos animais que em seus ciclos de vida enfrentam longos períodos de hipóxia ou anoxia ambiental (Lutz e Storey, 1997; Hervant, 1999 a,b).

Os resultados sugerem que durante o período de anoxia (1 h) estudado o *C. granulatus* estaria aumentando a produção de energia e estocando substratos energéticos para serem utilizados na segunda fase de ajuste à diminuição da  $\text{PO}_2$ , que é a depressão metabólica.

Também este trabalho demonstra que, independentemente da dieta administrada, os tecidos respondem de forma distinta ao estresse de anoxia, concordando com Chang (2005) que encontrou resposta diferenciada de expressão das proteínas de choque térmico (HSP) no hepatopâncreas e no músculo de lagosta após submeter os animais à hipóxia ambiental.

Concluindo, os resultados indicam que, nas condições de campo, quando o *C. granulatus* enfrenta períodos de hipóxia e de anoxia, a homeostase da glicose é mantida por mudanças no padrão metabólico, pois esta hexose é a principal fonte energética em crustáceos. Entretanto, a composição da dieta administrada aos caranguejos determina ajustes metabólicos diferenciados em resposta ao estresse de anoxia e à fase de recuperação pós-anoxia.

## Referências bibliográficas

- Allen C. E.; Tyler, P.A . ; Varney, M. S.; .2000. Lipid profile of *nematocarcinus gracilis* a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone. *Hydrobiologia*. 440 (1-3): 273-279.
- Anderson, S.J., Taylor, A.C., Atkinson, J.A. 1994. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). *Comp Biochem Physiol A* 108:515-522.
- Bushop, S. H.; e Burton, R. S. 1993. Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. *Comp. Bioch. Physiol.*, 106 A (1): 49-56.
- Bond-Buckup, G., Fontoura, N. F., Marroni, N. P., Kucharski, I. C. 1991. O Caranguejo: Manual para o ensino prático de zoologia; POA; Ed. Universidade/UFRGS.
- Botto, J.L., Irigoyen, H.P. 1980. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. contribucion al conocimiento biologico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. In: Seminario Latinoamericano en Ecología Bentónica y Sedimentología de la Plataforma Continental del Atlántico Sur, UNESCO, Montevideo, Uruguay. 161-169.
- Boschi, E. E. 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. *Bol Inst Biol. Mar (Mar del Plata)* 6:1-76.

- Bourdier, G. G., Amblard, C. A. 1989. Lipids in *Acanthodiptomus denticornis* during starvation and feed on three different algae. J. Plankton Res. 11, 1201-1212.
- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - Dye binding. Anal. Biochem. 72, 248 - 254.
- Bridges, C. R., Brand, A. R. 1980. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of marine crustacea. Comp. Biochem. Physiol., vol 65A, 399-409
- Brito, S.R.C., Moura, M. A. F, Kawashita, N. H., Brito, M. N., Kettelhut, I. C, Migliorini, R. H. 2001. Glucose uptake and glycolytic flux in adipose tissue from rats adapted to a high protein, carbohydrate-free diet. Metabolism 50:1208-1212.
- Brooks, S. P., Storey, K. B. 1997. Glycolytic controls in estivation and anoxia: a comparison of metabolic arrest in land and marine molluscs. Comp Biochem Physiol A Physiol, 118(4): 1103-14.
- Bromberg, E., 1992. Dinâmica osmótica e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão. Mestrado thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Bunt, A. H., Ashby, E. A. 1968. Ultrastructural changes in the crayfish sinus gland following electrical stimulation. Gen Comp Endocrinol, 1(3): 376-82.

- Cervino, C., Luquet, C. M., Haut, G. E., Rodriguez, E. M. 1996. Preferências de salinidade do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) após longo período de aclimação. *Atlântica* 18, 69-75.
- Chaisemartin, C. 1971. Mobilization des reserves de metabolites chez les Astacidae: influences comparées de la stabulation à jeûn et de certains états pathologiques. *C. R. Séances . Soc. Biol. Paris* 165, 671-676.
- Chang, E.; O'Connors, J.D. 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss,D.E. (ed.), *The Biology of Crustacea*. Academic Press,New York. p. 263-289.
- Chang, E.S. 1987. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Fingerman M., Nagabhushanam R., Thompson M.F. (eds), *Endocrinology and Reproduction Recent Advances in Marine Biotechnology vol 1* Science Publisher, New Hampshire, USA, pp 163-178.
- Chang, E. S. 2001. Crustacean hyperglycemic hormone family: Old paradigms and new perspectives. *American Zoologist* 41:380-388.
- Chang; E. S. 2005 Stressed-Out Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins. *Integr. Comp. Biol.*, **45: 43 - 50**.
- Charmantier–Dauers, M., Charmantier, G., Janssen, K.P.C., Aiken, D.E., Van Herp, F.1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. *Gen Comp Endocrinol* 94:281-293.

- Childress, J.J., Seidel, B.A. 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J Exp Biol* 201:1223-1232.
- Chittó, A. L. 2000. Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. Dissertação (Mestrado em ciências biológicas – Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Chittó, A. L. (2005) Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* (Dana 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão . Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese (Doutorado em ciências biológicas – Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Comoglio, L., Smolko, L.; Amin, O. 2005. Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 140(3):411-6.
- Cooper, A. W. 1974. Salt Marshes. In: Odum, H., Copeland B. J., Macmahon E. A. (eds) *Coastal Ecological Systems of United States*. The conservation Foundation, Washinton D C. V II p.55-98.

- Corssimit, E. P; M., Rominj, A., Sauerwein, H. P., 2001. Regulation of glucose production with special attention to non classical regulatory mechanisms: a review. *Metab. Clin. Exp.* 50,0742-755.
- Cuzon, G., Ceccaldi, H. J., 1972. Influence de la stabluation à Jeûn sur le metabolisme de la crevette Crangon crangon. *C. R. Séances Soc. Biol. Paris* 167, 66-69.
- Dean, J. M., Vernberg, F. J. 1965. Variations in the bood glucose level of crustacea. *Comp. Biochem. Physiol.* 14, 29-39.
- Da Silva, R. S. M., Kucharski, L. C. R. 1992. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem Physio* 101A: 631-634.
- De Kleij, D.P. V., Leeuw, E.P.H., Van Den Berg, M.C., Mrtens, G.J.M., Van Herp, F. 1995. Cloning and expression of two m RNAs ecoding different crustacean hyperglycemic hormones in the lobster *Hormanus americanus*. *Biochem Biophy Acta* 1260:62-66.
- Devlin, T.M. 2003. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. Edgard Blücher. 1084p.
- Dias, G. S. 1996. Estudo da gliconeogênese no manto e no hepatopâncreas do gastrópoda pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongos* (Muller, 1974). Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul .

- Dias, G. S. 2000. Estudo do efeito da anoxia ambiental e da fase de recuperação da anoxia sobre o metabolismo de carboidratos no gastrópode pulmonado terrestre *Megalobulimus oblongos* POA; Tese de Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- D’Incao, F., Rufino, M.L., Silva, K.G., Braga, A.C. 1990. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 na barra de Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). *Atlântida* 12: 85-93.
- Drach, P., Tchernigovtzeff, C. 1967. Sur la méthode de déyermation des satates d’intermue et son application générale aix crustacés. *Vie Milieu* 18, 595-607.
- Folch. K., Lees, M., Stanley, H. S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-503.
- Gäde, G. 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia and muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconectes limosus*. *Comp Biochem Physiol* 77 A:495-502.
- Garcia, F., Gonzalez-Baro, M., Pollero, R.2002. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids*, Jun 2002; 37(6): 581-5.
- Gilbert, L. I.,; O’Connor, J. D. 1970. Lipid metabolism and transport in arthropods. In *Chemical Zoology* (Edited by Florkin M. And Sheer, B. T.) Part5, Vol. 1 pp 229-254. Academic Press, new York.

- Gilles, R. 1987. Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. In: Gilles, R., Kleinzells, A., Bolis, I. (eds). Current topics membranes and transport, Vol 10. London: Academic Press; 205-247.
- Gilles, R., 1997. "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates. In: Dantzler, W. H. (Ed.), handbook of Comparative Physiology, vol. 2. Oxford University Press, New York. Pp. 1523-1586.
- Gonçalves, A. A.1993. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* Dana:1851 (Crustácea: Decapoda: Grapsidae) durante anoxia ambiental. Rio Grande: FURG, 1993. Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica).
- Gourdoux, L., Lequellec, Y., Moreau, R., Dutrien, L. 1983. Gluconeogênese from some amino acids and its endocrine modification in *Tenebrio molitor* (coleoptera). Comp. Biochem. Physiol. 74B (2): 273-276.
- Greenway, S.C, Storey, K.B. 1999. The effect of prolonged anoxia on enzyme activities in oysters (*Crassostrea virginica*) at different seasons. J Exp Mar Biol Ecol 242:259-272.
- Greenway, S.C., Storey, K.B. 2000. Seasonal changed and prolonged anoxia affect the kinetic properties of phosphofructokinase. Comp Physiol B 170:258-293.

- Habold, C., Foltzer-Jourdainne, C., Le Maho, Y., Lignot, J., Oudart, H. 2005. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. *J. Physiol.*, 566: 575 – 586.
- Hanson, R. W., Reshef, L. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev. Biochem.* 66: 581-611.
- Harlocker, S. L., Kapper, M. A., Greenwalt, D. E., Bishop, S. H. 1991. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from ribber mussel gill tissue: reactivity with metal ions, kinetics and action of 3-mercaptopicolinic Acid. *J. Exp. Zool.* 257: 258-298.
- Hartnol, R. G. 1988. Evolution, systematics and geographical distribution. In: Burggren, W. and McMahon, B (eds). *Biology of land Crabs*. Cambridge University Press, New York. P. 6-54.
- Hasek, B. E., Felder, D. L. 2005. Biochemical composition of ovary, embryo, and hepatopancreas in the grapsoid crabs *Armases cinereum* and *Sesarma nr. reticulatum* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 140(3): 455-63.
- Heath, J. R., Barnes, H. 1970. Some changes in biochemical composition with season and during the moulting cycle of the common shore crab, *carcinus maenas* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 5, 199-233.
- Henry, R.P., Booth, C.E, Lallier, F., Walsh, P. 1994. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J Exp Biol* 186:215-234.

- Herreid, C.F., Full, R.J. 1988. Energetics and locomotion. In:Macmahon B.(ed).  
Biology of Land Crabs. Cambridge University Press, Cambridge. p337-377.
- Herreid II. C. F., O'Mahoney, P. M. Shan, G. M.1979. cardiac and respiratory  
response to hypoxia in the land crab *Cardisoma guanhumi*. Comp. Biochem.  
Physiol. 63A, 145-151.
- Herreid II, C. F. 1980. Hypoxia in invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 67A,  
311-320.
- Hervant, F., Mathieu, J., Garin, D., Fréminet, A. 1995. Behavioral, ventilatory, and  
metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the  
hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigean *Gammarus fossarum*  
(Crustacea: Amphipoda). Physiol Zool 68:223-244.
- Hervant, F. 1996. The activities of enzymes associated with the intermediary and  
energy metabolism in hypogean and epigean crustaceans. C R Seances Acad  
Sci Ser III Sci Vie 319:1071-1077.
- Hervant, F., Mathieu, J., and Messana, G. 1997. Locomotory, ventilatory and  
metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda)  
to severe hypoxia and subsequent recovery. C R Seances Acad Sci Ser III Sci  
Vie 320:139-148.
- Hervant, F., Garin, D., Mathieu, J., and Fréminet, A. 1999a. Lactate metabolism and  
glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-  
hypoxic recovery. J Exp Biol 202:579-592.

- Hervant, F., Mathieu, J., and Culver, D.C. 1999b. Comparative responses to severe hypoxia and subsequent recovery in closely related amphipod populations (*Gammarus minus*) from cave and surface habitats. *Hydrobiologia* 392:197-204.
- Hervant, F., Renault, D. 2002. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigeal isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *J. Exp. Biol.* 205, 2079-2087.
- Hiller-Adams, P., Childress, J. 1983. Effects of feeding, food history and food deprivation on respiratory and excretion rates of the bathypelagic mysid *Gnathophausia ingens*. *Biol. Bull.* 165: 182 - 196.
- Hochachka, P.W., Somero, G. N., Schneider, D. E., Freed, J. M. 1970. The organization and control of metabolism in the crustacean gill. *Comp. Biochem. Physiol.*, 33: 529-548.
- Hochachka, P.W., Mustafa, T. 1972. Invertebrate facultative anaerobiosis. *Science* 178:1056-1060.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, New Jersey. 538 p.
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia, tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B* 130: 435-459.
- Huggins, A. K., Munday, K. A., 1968. Crustacean metabolism. *Adv. Comp. Physiol. Biochem*, 3,: 271-378.

- Jeckel, W. H., Demoreno, J. E. <sup>a</sup>, Moreno, V. J. 1991. Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. *Comp. Biochem. Physiol.*, B 98: 253-260.
- Johnston, M. A., Davies, P. S. 1972. carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, Part B41, 433-443.
- Kawashita, N.H., Brito, S.R.C., Moura, M.A.F., Festuccia, W.T.L., Garofalo, M.A.R., Machado, U.F., Kettelhut, I.C., Migliorini, R.H. 2002. Glucose uptake, glucose transporter GLUT 4, and glycolytic enzymes in brown adipose tissue from rats adapted to high-protein diet. *Metabolism* 51, 1501-1505.
- Keller, R. 1992. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. *Experientia* 48:439-448.
- Khayat, M., Yang, W.J., Aida, K., Nakasawa, H., Tietz, A., Funkenstein, B., Lubzens, E. 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *Gen Comp Endocrinol* 110:307-318.
- Kraus-Friedmann, N. 1984. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis. *Physiol. Rev.* 64: 170-259.
- Kucharski, L. C. R.. 1990. Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídeos totais no hepatopâncreas e no músculo do carabguejo *Chasmagnathus granulatus*. Porto Alegre> UFRGS. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas-

Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M. 1991a. Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp Biochem Physiol* 100 A: 599-602

Kucharski L.C.R., Da Silva R.S.M. 1991b. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Comp Biochem Physiol* A 99:215-218.

Lallier, F. H., Walsh, P. J. 1991. Metabolic potencial in tissue of blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bull. Mar. Sci.* 48, 665-669.

Lang, F., Busch, G. KL., Ritter, M., Volkl, H., Waedegger, S., Gulbins, E., Haussonger, D. 1998. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiol Rev*, 78: 247.

Legate, N.J., Bonen, A., Moon, T.W. 2001. Glucose tolerance and periphereal glucose utilization in raibow trout (*Oncorhyncus mykiss*), american eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameirus melas*). 2001. *Gen Comp End* 122:48-59.

Loret, S.M.; Van Der Goor, N.; Devos, P.E. 1989. Susoensions d'hemocytess et d'hepatopancreatocytess pour létude *in vitro* de la charge en glucose chez um Crustacé Décapodé. *Oceanis*, 15: 419-431.

- Loret, S.M.; Devos, P.E. 1992. Structure and possible functions of the calcospherite-rich cells (R-cells) in the digestive gland of the shore crab *Carcinus maenas*. Cell Tissue Res., 267: 105-111.
- Lynch, M. P., Weeb, K. L. 1973. variations in serum constituents of the blue crab *Callinectes sapidus*: total serum protein. Comp. Biochem. Physiol. 44<sup>a</sup>, 1237-1249.
- Lyndon, A. R. E., Houlihan, D. F. 1988. Gill protein turnover: costs of adaptation. Comp. Biochem. Physiol., 119A. (1): 27-34.
- Mañe-Gazon, F., Dei-cas, E., Spector, B. H., Leymonte, J., 1974. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851: I osmorregulación frente a cambios de salinidad. Physis Secc. A33, 163-171.
- Marsden, I. D., Newell, R. C., Ahsanullah, M. 1973. The effect of starvation on the metabolism of the shore crab, *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol.. 45, 195-213.
- Marks, D., B.; Marks, A. D.; Smith, C.,M. 1996. Basic Medical Biochemistry. Baltimore: R.R. Donnelly & Sons, 806p.
- Marqueze, A., (2004). Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulatus* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas. Porto Alegre: UFRGS, 2004. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Marqueze A, Kucharski L.C.R., Da Silva R.S.M., 2006. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the muscle of *Chasmagnatus granulata* crabs maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. EUA, v. 2, n. 332, p. 198-205.
- Mayzeau, P., 1976. respiration and nitrogen excretion of zooplankton. IV. The influence of starvation on the metabolism and the biochemical composition of some species. Mar. Biol. 37, 47-58.
- Meenakshi, V. R., Sheer, B. T. 1961. metabolism in the crabs *Cancer magister* and *Hemigrapsus nudus*. Comp. Biochem. Physiol. 3, 30-41
- Meton, I., Mediavilla, D., Caseras, A., Canto, E., Fernandes, F., Baanante, I.V. 1999. Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis-gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). British J Nutrition 82:223-232.
- Mithieux, G., Rajas, F., Gautier-Stein, A. 2004. A Novel Role for Glucose 6-Phosphatase in the Small Intestine in the Control of Glucose Homeostasis J. Biol. Chem., 279: 44231 - 44234.
- Morris, S., Van Aardt, W. J., Ahern, M. D. 2005. The effect of lead on the metabolic and energetic status of the Yabby, *Cherax destructor*, during environmental hypoxia. Aquatic Tox. 75: 16-31.

- Morris, S., Adamczewska, A. 2002. Utilization of glycogen, ATP, and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. *Comp Biochem Physiol A* 133:813-825.
- Morris, S., Airriess, C.N. 1998. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. *S. Afr. J. Zool.* 33: 87-106.
- Moon, T.W. 1988. Adaptation, Constraint, and function of gluconeogenic pathway. *Can J Zool.* 1058-1069.
- Munday, K.A., Gilles, I.G., Poat, P.C. 1980. Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase. *Comp Biochem Physiol B* 67:403-411.
- Munday, K.A., Poat, P. C. Respiration and energy metabolism in crustacea. In: Florkin M., Scheerm B. T. (eds). *Chemical Zoology*, Vol. New York: Academic Press; 1971: 191-211.
- Mustafa, T., Seub, J., Jorgeusen, J. B., Hoffmann, K. H. 1983. Gluconeogenesis in facultative anaerobic invertebrates: evidence of oxaloacetate decarboxylation and anaerobic end product incorporation into glycogen from tissues of *Tubilex sp.* *J. Comp. Physiol.* 149: 477-483.
- Nery, L. E. M. Santos, E. A. 1993. Carbohydrate Metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106B (3), 747-753.

- Nicol, S., Virtue, P., King, R., Davenport, S. R., McGaffin, A. f., Nichos, P. 2004. Condition of *Euphausia crystallophias* off East Antarctica in winter in comparison to other seasons. Deep-sea Research part II. 51 (17-19): 2215-2224.
- Nordie, R. C., Foster, J. D., Lange, A. J. 1999. regulation of glucose production by the liver. Annu Rev. Nutr. 19, 379-406.
- Odum, E P. 1985. Ecologia. Interamericana (ed), Rio de Janeiro, 435p.
- Oliveira, G.T; Da Silva, R. S. M. 1997. Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp Biochem Physiol A 118: 1429-1435.
- Oliveira, G. T., Da Silva, R.S.M. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp Biochem Physiol B 127:375-381.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. Mar Biol 139:335-342.
- Oliveira, G.T., Eicheler, P., Rossi, I.C., and Da Silva, R.S.M. 2004 a. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. J Exp Zool A 301:240-248.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M. 2004 b. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting crabs

previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp Biochem Physiol A* 137:383-390.

Panserat, S., Medale, F., Blin, C., Breque, J., Vachot, C., Plagnes-Juan, E., Gomes, E., Krishnamorthy, R., Kaushik, S. 2000a. Hepatic glucokinase is induced by dietary carbohydrates in rainbow trout, gilthead seabream and common carp. *Am J Physiol* 278:1164-1170.

Panserat, S., Medale, F., Breque, J., Kaushik, S. 2000b. Lack of significant long-term effect dietary carbohydrates on hepatic glucose 6-phosphate expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Nutr Biochem* 11:22-29.

Panserat, E., Plagnes-Juan, E., Kaushik, S. 2001. Nutritional regulation and tissue specificity of gene expression for proteins involved in hepatic glucose metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 204:2351-2360.

Pasteur, L. 1861. Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp Rend Acad Sci* 52:12 60-1264.

Pellegrino, R. (2006). Efeito do jejum e da realimentação sobre a gliconeogênese e a neoglicogeniogênese no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido previamente à dieta rica em proteínas ou carboidratos. Porto Alegre: UFRGS, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Percy, J. A. 1993. Energy consumption and metabolism during starvation in the Arctic hiperiid amphipod *Themisto libellula*. *Mand. Polar Biol.* 13, 549-555.
- Quillard, M., Renouf. S., Husson, A., Meisse, D., Lavoinne, A. 1997. Glutamine and regulation of gene expression in mammalian cels. Special reference to Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). *Biochimia*, 79: 125-128.
- Regnault, M. 1981. Respiration and ammonia excretion of the shrimp *Cragon cragon* L., metabolis response to prolongedd starvation. *J. Comp. Physiol.* 141, 549-555.
- Rosa, R., Calado, R., Andrade, A. M., Narciso,I., Nunes, M. L. 2005. Changes in amino acids and lipids during embryogenesis of European lobster, *Homarus gammarus* (Crustacea: Decapoda). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*,140(2):241-9.
- Rosa, R., Nunes, M. L. 2003. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* ans *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese south coast. *Crustaceana* 75(9): 1095-1105.
- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Le Priol, Y., Pascual, C., Rossigniol, J., Contreras, F., Sanchez, A., Van Wormhoudt, A. 2001. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect salinity and dietary carbohydrate levels. *J Exp Mar Biol Ecol* 259:1-22.

- Santos, E.A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C. 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Comp Biochem Physiol A* 88:21-25.
- Santos, E. A., Nery, L. E., Manzoni, G. C., 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of the *Chasmagnathus granulata* dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 89A: 329-332.
- Santos, E.A., Keller, R. 1993 a. Effect of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentration in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp Biochem Physiol A* 106:343-347.
- Santos, E.A, Keller, R. 1993 b. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: current perspectives. *Comp Biochem Physiol A* 106:405-411.
- Sasaki, G. C., Capuzo, J. M., Bleslot, P. 1986. Nutritional and bioenergetic considerations in the development of the American lobster *Homarus americanus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 43, 2311-2319.
- Schmitz, A., Harrison, J. F. 2004. Hypoxic tolerance in air-breathing invertebrates. *Resp. Physiol. Neurob.* 141: 229-242.
- Sedlmeier, D. 1985. Mode action of the crustacean hyperglycemic hormone. *Amer. Zool*, 25, 223-232.

- Shafer, H. J. 1968. Storage material utilized by starves pink shrimp, *Penaeus duorarum*, Burkenroad. Proc. World Sci. Conf. Biol. Cult. Shrimps. F. A. O. Fish. Rep. 57, 393-403.
- 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. POA, Dissertação de mestrado em ciências Biológicas-Fisiologia. Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.
- Schein, V., Waché, Y., Etges, R., Kucharski, L.C.R., Van Wormhoudt A., Da Silva, R.S.M. 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. FEBS Letters 561:202-206.
- Schmidt, H., Zerbst- Boroffka, i. 1993. Recovery after anaerobic metabolism in the leech *Hirudo medicinalis*. J. Comp. Physiol. 163B: 574-580.
- Schmitt, A.S.C., Santos, E. A. 1993. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana.1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. Comp Biochem Physiol A 106:329-336.
- Serrano, L., Blanvillain, G., Soyes, D., Charmantier, G., Grousset, E., Aujoulat, F., Spanings-Pierrot, C. 2003. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus Leptodactylus*. J Exp Biol. 206:979-988.

- Silbert, V., Ouellet, P., Brethes, J. C. 2004. Changes in yolk total proteins and lipids components and embryonic growth rates during lobster (*Homarus americanus*) egg development under a simulated seasonal temperature cycle. Mar. Biol. 144 (6): 1075-1086.
- Simpfendorfer, R.W., Vial, M.V., López, D.A., Verdala, M., González, L. 1995. Relationship between the aerobic and anaerobic metabolic capacities and the vertical distribution of three intertidal sessile invertebrates: *Jehlius cirratus* (Darwin) (Cirripedia), *Perumytilus purpuratus* (Lamarck) (Bivalvia) and *Mytilus chilensis* (Hupé) (Bivalvia). Comp Biochem Physiol B 111:615-623
- Smith, R. W., Houlihan, D. F., Nilsson, G. E., Brechin, J. G. 1996. Tissue-specific changes in protein synthesis rates in vivo during anoxia in the crucian carp. Am. J. Physiol. 271, 897-904.
- Speed, S.R., Baldwin, J., Wong, R.J., Wells, R.M.G. 2001. Metabolic characteristics of muscle in the spiny lobster, *Jasus edwardsi*, and responses to emersion during simulated live transport. Comp Biochem Physiol B 128:435-444.
- Storey, K.B. 1998. Mechanism of glycolytic control during facultative anaerobiosis in a marine mollusk: tissue-specific analysis of glycogen phosphorylase and fructose-2,6-biphosphate. Can Zool 66:1767-1771.
- Storey, K. B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. Braz J Med Biol Res, 29(12): 1715-33.

- Tielens, A. G., van de Pas, F. A., van den Heuvel, J. M., van den Bergh, S. G. 1991. The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Mol Biochem Parasitol*, 46(1): 181-4.
- Thabrew, M. I., Poat, P. C., Munday, K. A. 1971. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. *Comp. Biochem. Physiol., Part B* 40, 531-541.
- Turcato, G.S., 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Thompson, R. K., Pritchard, A.W. 1969. Respiratory adaptations of the two burrowing crustaceans *Callinassa Californiensis* and *Upogebia pugettensis*. *Biol Bull* 136:274-287.
- Van Aardt, W.J. 1988. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamnautes warreni* Calman, during anoxia and subsequent recovery. *Comp Biochem Physiol A* 99:299-304.
- Van Handel, E. 1965. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. *Anal Biochem.* 11:226 - 265.
- Vinagre, A. S., Da Silva, R. S. M. 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp Biochem Physiol* 102: 579-583.

- Vinagre, A .S, Da Silva, R. S. M. 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana,1851). Can J Zool 80:1413-1421.
- Vinagre, A S., Amaral A, P N., Ribarcki, F. P., Silveira, E., Périco, E. 2007. Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú beach (Brazil). Comp Biochem. Physiol, Part A 146: 514-519.
- Wainwright, G., Webster, S.G., Wilkinson, M.C., Chung, J.S., Rees, H.H. 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus* – involvement in multi-hormonal regulation of growth and reproduction. J Biol Chem 271:12749-12754.
- Walsh, P. J., Henry, R. P. 1990. Activities of metabolic enzymes in the deep-water crabs *Chaceon fenneri* and *C. quinqueedens* and shallow-water crab *Callinectes sapidus*. Mar. Biol. 106: 343-346.
- Watcher, B. D., Sartoris, F. J., Pörtner, H.O. 1997. The anaerobic end product lactate has behavioural and metabolic signaling function in the shore crab *Carcinus maenas*. J Exp Biol 200:1015-1024.
- Webster, K.A., Gunning, P.W., Hardeman, E., Wallace, D.C., Kedes, L.H. 1990. Coordinate reciprocal trends in glycolytic and mitochondrial transcript accumulations during the in vitro differentiation of human myoblast. J Cell Physiol 142:566-573.

- Webster, K. A, 2003. Evolution of coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Biol.* 206, 2911-2922.
- Wiese, T. J., Lambeth, D. O., Ray, P. D. 1991. The intracellular distribution and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds. *Comp Biochem Physiol B.* 100(2): 297-302.
- Willmore, W.G., Cowan, K.J., Storey, K.B. 2001. Effects of anoxia exposure and aerobic recovery on metabolic enzyme activities in the freshwater turtle *Trachemys scripta elegans*. *Can J Zool* 79:1822-1828.
- Wood, C.M., Randall. D.J. 1981. Haemolymph gas transport, acid-base regulation and anerobic metabolism during exercise in the land crab (*Cardisoma carnifex*). *J Exp Zool* 218:23-35.
- Yang, W., Aida, K., Nagasawa, H. 1997. Amino acid sequence and activities of multiple hyperglycemic hormones from the Kuruma prawn, *Penaeus aponicus*. *Peptides* 18:479-485.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, Sep 1982; 217: 1214 - 1222.
- Yasuda, A., Yasuda, Y., Fujita, T., Naya, Y. 1994. Characterization of crustacean hyperglycemic hormone from the crayfish (*Procambarus clarkii*): multiplicity of molecular forms by sterioinversion and diverse function. *Gen Comp Endocrinol* 95:387-398.

Zammit, V. A., Newsholme, E. A. 1976. The maximum activities of Hexokinase, Phosphorilase, Phosphofrutokinase, Glycerol phosphate dehydrogenases, Lactate dehydrogenase, Octopine Dehydrogenase, Phosphoenolpyruvate carboxykinase, Nucleoside Diphosphatekinase, Glutamate-Oxaloacetate Transaminase and Arginine Kinase in relation to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. *Biochem. J.* 160, 447-462.

Zou, E., Du, N., Lai, W. 1996. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol A* 114:105-109.