

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

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS GLICONEOGÊNICA, GLICOGÊNICA E
LIPOGÊNICA NO PROCESSO DE OSMORREGULAÇÃO, *in vitro*, EM
TECIDOS DO CARANGUEJO *Neohelice granulata* (DANA, 1851)

Dissertação de Mestrado

BETTEGA COSTA LOPES

Porto Alegre, 2014

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

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS GLICONEOGÊNICA, GLICOGÊNICA E
LIPOGÊNICA NO PROCESSO DE OSMORREGULAÇÃO, *in vitro*, EM
TECIDOS DO CARANGUEJO *Neohelice granulata* (DANA, 1851)

BETTEGA COSTA LOPES

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins Da Silva

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

Porto Alegre, 2014

Comissão Examinadora

Wania Aparecida Partata

Prof^a Doutora do Programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia - UFRGS

Guendalina Turcato de Oliveira

Prof^a Doutora do Programa de Pós-
graduação em Zoologia – PUCRS

Denise Zancan

Prof^a Doutora do Programa de Pós-
graduação em Neurociências - UFRGS

Dedico este trabalho a todos aqueles que de alguma forma ou outra me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Dra. Roselis S. M. Da Silva, pela oportunidade dada de fazer parte de sua equipe, pela sua sapiência e por ser um exemplo de incentivo à busca do conhecimento;

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski pela amizade e auxílio nos experimentos;

Aos demais Professores do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), Professor Luciano S. De Fraga e demais Professoras Anapaula S. Vinagre e Márcia Trapp;

Aos meus colegas de laboratório e bolsistas de iniciação científica pelo convívio diário e troca de experiências;

A todos os Professores do curso de Pós-graduação, pelo conhecimento transmitido ao longo desses anos;

À minha família;

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

RESUMO

Os estuários são ecossistemas que apresentam uma constante variação no seu ambiente físico-químico, como teor de oxigênio dissolvido, temperatura ambiente, e principalmente de salinidade da água. O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos do estresse osmótico (hipo e hiperosmótico) agudo (1h), *in vitro*, sobre as vias gliconeogênica, glicogênica e lipogênica em tecidos de caranguejos *N. granulata*.

No presente estudo não foram constatadas variações na incorporação de ^{14}C -alanina em glicose ou glicogênio no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores. No entanto, foi constatada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na incorporação de ^{14}C -alanina em glicose nas brânquias posteriores durante os ajustes osmóticos a um meio mais concentrado.

No hepatopâncreas não foram observadas variações na conversão de ^{14}C -alanina em lipídeos, porém, nas brânquias anteriores houve uma diminuição na síntese de ^{14}C -lipídeo a partir de ^{14}C -alanina no choque hiperosmótico, enquanto que nas brânquias posteriores houve um aumento na síntese de lipídeos durante o choque hiposmótico.

O presente trabalho mostra claramente que o fluxo de carbonos da alanina pode ser direcionado tanto para o metabolismo da glicose como de lipídios com o objetivo de aumentar ou diminuir os níveis de aminoácidos intracelulares.

PALAVRAS-CHAVE: Osmorregulação, *N. granulata*, RVD, RVI

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

Ba(OH)₂ – Hidróxido de bário

DPM – Desvio padrão médio

HC – *High-diet carbohydrate* - (Dieta rica em carboidratos)

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

HP – *High-diet protein* - (Dieta rica em proteínas)

MeAIB – 3-amino-2,2-dimethyl-propanoic acid

PEP – Fosfoenolpiruvato

PEPCK – Fosfoenolpiruvato carboxicinase

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

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

PPO – 2,5-diphenyloxazole

RPM – Rotações por minuto

RVD – *Decrease volume regulatory* - (Diminuição do volume regulatório)

RVI – *Increase regulatory volume* - (Aumento do volume regulatório)

SFC – Solução fisiológica para caranguejo

TCA – Ácido tricloroacético

ZnSO₄ – Sulfato de zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de transporte e hormônios envolvidos em resposta as alterações do volume celular em mamíferos.....	3
Figura 2 – Sistemas de transporte de aminoácidos nas células de invertebrados e vertebrados	9
Figura 3 – Esquema das vias glicolítica e gliconeogênica	11
Figura 4 – Efeitos de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico, <i>in vitro</i> , sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose (figura A) e ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicogênio (figura B) no hepatopâncreas de caranguejos <i>N. granulata</i>	24
Figura 5 – Efeitos de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico, <i>in vitro</i> , sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose (figura A) e ^{14}C -glicogênio (figura B) nas brânquias anteriores de caranguejos <i>N. granulata</i>	26
Figura 6 - Efeitos de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico, <i>in vitro</i> , sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose (figura A) e ^{14}C -glicogênio (figura B) nas brânquias posteriores de caranguejos <i>N. granulata</i>	28
Figura 7A - Efeitos de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico, <i>in vitro</i> , sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídeo no hepatopâncreas de caranguejos <i>N. granulata</i>	29

Figura 8A - Efeitos de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídeos nas brânquias anteriores de caranguejos *N. granulata* 30

Figura 9A - Efeitos de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídeos nas brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata* 31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. Animais	17
3.2. Procedimentos experimentais	17
3.3. Determinação da conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose ...	18
3.4. Determinação da síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -alanina	20
3.5. Determinação da conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídios ...	21
3.6. Análise estatística	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

O ambiente estuarino devido às variações diárias de salinidade e de oxigênio dissolvido na água é considerado um habitat bastante estressante a sua biota. A salinidade da água dos estuários é controlada pelas marés, pelos ventos, pela precipitação pluviométrica e pela temperatura ambiente. Para isso, os organismos estuarinos necessitaram desenvolver mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos que permitissem uma rápida resposta às variações dos parâmetros ambientais, em especial, da salinidade da água. Assim, a capacidade osmorreguladora desempenhou um importante papel na adaptação desses animais ao ambiente estuarino (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). O desenvolvimento de estratégias metabólicas, em resposta às mudanças no meio externo, contribuiu de forma vital para a capacidade osmorreguladora face às alterações bruscas do meio externo (STOREY & STOREY, 2005).

Para que as células possam desencadear essas respostas osmorreguladoras são necessários: a) um sistema capaz de detectar mudanças transitórias no volume celular; b) uma sinalização intracelular que traduza essas informações visando os ajustes de volume e; c) uma “memória” do volume original da célula, que estabelecerá o tempo para a inativação do processo regulatório (PASANTES-MORALES et al., 2006).

Estudos realizados com hepatócitos de mamíferos mostram alguns efeitos da variação da concentração do meio extracelular sobre o volume celular. Células submetidas ao meio hiposmótico incham e, dentro de minutos, retornam, parcialmente, ao seu volume original. Esse comportamento foi denominado redução do volume celular regulatório (*regulatory cell volume*

decrease - RVD). Inversamente, a exposição súbita ao meio hiperosmótico leva a um aumento do volume celular e, após poucos minutos, ocorre aumento regulatório do volume (*volume regulatory increase* – RVI), retornando o volume aos níveis iniciais. Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou RVI podem apresentar variações segundo o tipo celular, mas em geral envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons e solutos orgânicos através da membrana plasmática (HÄUSSINGER et al., 2004).

Mudanças de volume celular modificam várias funções metabólicas. O aumento de volume celular favorece a síntese e inibe a degradação de proteínas, de glicogênio e, em menor extensão, de lipídios. A diminuição de volume celular tem efeito oposto. Assim, o aumento de tamanho celular causado pelo estresse hiposmótico pode ser considerado como um sinal anabólico, enquanto que a redução de volume celular favorece o catabolismo (LANG et al., 1998).

Durante esses ajustes celulares, visando a manutenção do meio interno, a saída de íons como o K^+ e o Cl^- durante o ajuste osmorregulatório ao estresse hiposmótico, além da captação de Na^+ e KCl^- no ajuste hiperosmótico, parecem ser os principais mediadores das respostas celulares imediatas (STRANGE, 2004). Além disso, Yancey et al. (1982) descreveram a importância dos solutos orgânicos, tais como, os aminoácidos, os polióis e as metilaminas como osmólitos.

Contudo, esses processos são influenciados por múltiplos fatores, inclusive os hormonais. Häussinger et al. (2004), ao investigarem a influência dos fatores hormonais envolvidos na regulação do volume celular em mamíferos, observaram que a insulina foi capaz de estimular a atividade do co-

transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ e a captação desses íons, promovendo assim um aumento do volume celular em direção a isosmolaridade, enquanto o glucagon teve a capacidade de aumentar a saída de K^+ e de Cl^- do meio intracelular. A figura abaixo sintetiza todos os processos que estão envolvidos na regulação do volume celular.

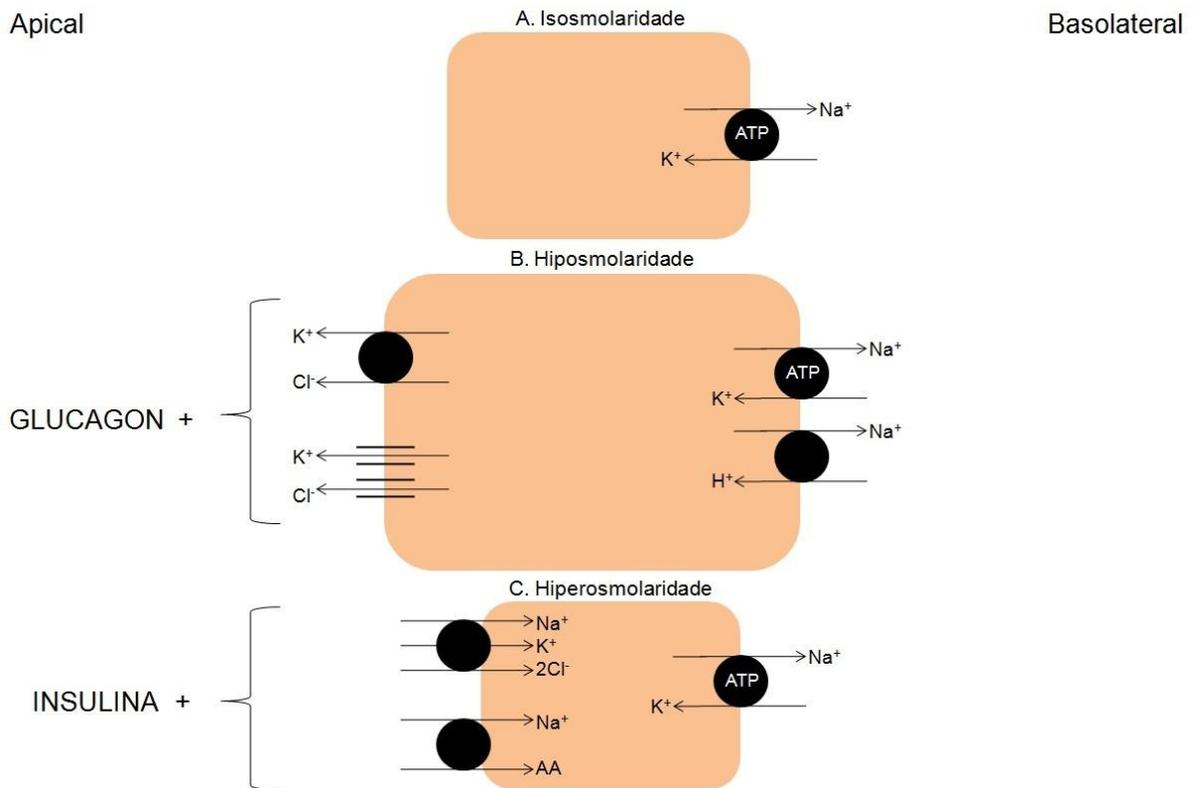


Figura 1 – Mecanismos de transporte e hormônios envolvidos em resposta as alterações do volume celular em mamíferos. Modificada de Hoffmann et al. (2009), Häussinger et al. (2004) e Strange (2004):

Em síntese, a necessidade de um ajuste apropriado, capaz de minimizar as perturbações osmóticas do ambiente é de extrema importância para a manutenção da integridade celular, em especial, naqueles organismos

que vivem sob constantes variações de salinidade em seu habitat (KINNE, 1993; CHAMBERLIN & STRANGE, 1989).

Entre esses organismos encontra-se o caranguejo *Neohelice granulata*, uma espécie tipicamente estuarina que evoluiu a partir de formas marinhas e situa-se sistematicamente na Superclasse Crustácea, Ordem Decapoda. Esta espécie habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro, além de estar distribuído ao longo de toda costa do Uruguai até a Argentina (SAKAI, 2006, BOTTO & IRIGOYEN, 1980).

Os estuários são a transição entre o ambiente marinho e o límnic e se caracterizam por períodos irregulares de total cobertura com água e outros com total exposição ao substrato. Esses ecossistemas sofrem influências tanto de fatores oceanográficos como meteorológicos, impondo a sua biota um elevado estresse ambiental o qual pode ser gerado pelas variações de salinidade, de temperatura, de pH e de oxigênio dissolvido na água (VALLE et al., 2009).

Para lidar com essa constante instabilidade, a capacidade osmorreguladora e a heterogenia dos padrões osmorregulatórios desempenharam um importante papel na evolução e na conquista do habitat estuarino pelos organismos. Por exemplo, em crustáceos eurialinos a osmolalidade do fluido extracelular pode variar de maneira diversa em função da osmolalidade do meio ambiente. Logo, a habilidade de controlar o balanço osmótico e reparar os danos induzidos pelo estresse osmótico, passou a ser essencial a vida celular (McNAMARA e FARIA, 2012, BIANCHINI et al., 2008).

Em seu habitat, o *N. granulata* abre galerias ou tocas com profundidades variáveis de acordo com o nível das marés e do lençol freático, de maneira que no fundo da toca sempre haja água. Essas habitações têm papel importante na ecofisiologia do *N. granulata*, pois minimizam as variações de salinidade, de temperatura e de teor de oxigênio no ambiente (TURCATO et al., 1990).

Na lagoa de Tramandaí-RS, onde populações de *N. granulata* são encontradas em abundância, os animais sofrem variações sazonais e circadianas de salinidade da água (VALLE et al., 2009). Nesta lagoa, os maiores valores de osmolalidade da água ocorrem no verão, com cerca de 529mOsm/kg H₂O. No outono foram constatados os menores níveis de osmolalidade, cerca de 96mOsm/kg H₂O.

Conforme Bromberg (1992), o *N. granulata* pode ser classificado como um regulador hiper-hipo osmótico eurialino, uma vez que suporta amplas variações de salinidade, sendo capaz de hiperregular de 0‰ a 20‰ e hiporregular em 40‰. O ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e verão, respectivamente.

Segundo Gilles e Delpire (1997), os crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: a) a regulação anisosmótica do fluido extracelular, que tem por objetivo controlar a osmolalidade do meio externo, independente do meio em que o animal se encontra; b) a regulação isosmótica do fluido intracelular, que tem como intuito mantê-lo isosmótico em relação ao extracelular.

A regulação isosmótica do fluido intracelular implica em duas fases de controle do volume celular: a) a primeira é relativa às respostas imediatas

de alteração de volume, como consequência de choques osmóticos e envolve a plasticidade da membrana plasmática; b) a segunda fase de reajuste esta relacionada com os eventos de influxo e efluxo de osmólitos, tanto orgânicos como inorgânicos. (GILLES & DELPIRE, 1997).

Dentre as estruturas responsáveis pelo controle da osmolalidade dos fluidos em crustáceos, as brânquias apresentam uma complexa estrutura e são órgãos multifuncionais (FREIRE et al., 2008). Estes animais por não apresentarem uma boa adaptação ao meio aéreo desenvolveram a estratégia de lidar com este meio (MORRIS, 2001). Quando fora d'água, captam a umidade através de tufo de cerdas presentes na base de seus pereiópodos e armazenam no braquioestergito com a função de mantê-las sempre umedecidas e assim possibilitar o equilíbrio hidro eletrolítico (BOND-BUCKUP et al. 1991). Fundamentalmente, os pares 3, 4, 5 compõem as brânquias anteriores, responsáveis pela respiração, enquanto os pares 6, 7, 8 constituem as posteriores, com função predominantemente de osmorregulação e de secreção de amônia (GENOVESE et al. 2004).

Durante os choques osmóticos foi demonstrado que ajustes enzimáticos, como o da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, exercem um importante papel na regulação osmótica da hemolinfa desses crustáceos ao promover o movimento transepitelial de íons e mediar a captação de NaCl durante o ajuste ao estresse hiposmótico. A atividade e a expressão dessa enzima são mais marcantes nas brânquias posteriores do que nas anteriores durante o ajuste osmótico (LUQUET et al., 2005; LUCU & TOWLE, 2003).

Entretanto, assim como em humanos a regulação do volume celular em crustáceos também parece sofrer influência de fatores hormonais. Serrano

et al. (2003), observaram que no lagostim *Astacus leptodactylus* apedunculado a osmolalidade da hemolinfa diminuiu significativamente após 28 dias e que a osmolalidade dos fluidos desse animal retornava ao normal quando injetados com extratos preparados a partir do homogeneizado de pedúnculos.

Durante os choques hipo e hiperosmóticos a participação efetora de íons inorgânicos como o K^+ , proporciona uma limitação imediata da alteração excessiva do volume celular durante variações osmóticas do ambiente extracelular. Entretanto, os efetores orgânicos, como os aminoácidos, a betaína e o glicerol, são considerados os principais responsáveis pelo reajuste do volume celular durante alterações osmóticas do meio intracelular (GILLES & DELPIRE, 1997).

De fato, a participação do metabolismo intermediário durante a aclimação tem uma grande importância no processo adaptativo do *N. granulata* ao meio ambiente. Jahn et al. (2004) observaram uma resposta distinta entre a captação de colina nas brânquias (anteriores e posteriores) e no hepatopâncreas de animais submetidos ao estresse hiperosmótico. Durante a exposição por 72 horas ao meio concentrado os autores verificaram que a captação de colina diminuía significativamente nas brânquias, enquanto no hepatopâncreas ela se mostrava aumentada. Os mesmos autores, no entanto, não observaram diferença alguma durante a exposição aguda (1, 2, 6 e 24 horas) ao estresse osmótico. Não obstante, Schein et al. (2004) observaram que neste caranguejo os aminoácidos exercem importante função durante a aclimação aos extremos de salinidades.

Em crustáceos, a concentração de aminoácidos livres intracelulares é 10 vezes maior que em humanos (PÉQUEUX, 1995). Eles exercem uma

importante função no organismo como um todo, tendo um papel crucial em uma série de processos biológicos como precursores da síntese de proteínas, de geração de energia metabólica, bem como, doadores de átomos de carbono e de nitrogênio, de neurotransmissores, de componentes de sistemas de tamponamento e de osmólitos (KILBERG & HÄUSSINGER, 1992). Entretanto, para serem transportados para dentro das células eles necessitam, além de uma diferença de concentração entre os espaços extra e intracelulares, serem transportados por intermédio de proteínas específicas. Existem diferentes proteínas envolvidas no transporte de aminoácidos: aquelas responsáveis pelo transporte de aminoácidos neutros, denominados sistemas A, ASC e L e, aquelas que transportam aminoácidos aniônicos X_{ag}^- , X_c^- e catiônicos y^+ .

O sistema A, transporta aminoácidos de cadeia lateral não ramificada de vários tamanhos, como a glicina, alanina, metionina, glutamina e prolina, através de um co-transporte eletrogênico dependente de sódio numa estequiometria de 1:1. Este sistema é sensível a mudanças no potencial elétrico da membrana, bem como está sujeito a regulação por intermédio das condições ambientais e da osmolalidade externa (YAO et al., 2000; GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

O sistema ASC, também é sódio-dependente e sensível a mudanças no potencial elétrico da membrana, porém não é eletrogênico, pois o transporte de aminoácidos para dentro da célula juntamente com sódio, é contrabalançado pela saída deste mesmo íon (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

Por fim, o sistema L, que transporta tanto aminoácidos neutros, como de cadeia lateral ramificada (valina, leucina e isoleucina) além de ser

independente de sódio e do potencial elétrico de membrana (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

Não menos importante, os sistemas X_{ag}^- e x_c^- , transportam ácido aspártico e ácido glutâmico, bem como, glutamato e cistina, respectivamente, e o sistema y^+ transporta aminoácidos catiônicos como lisina e arginina (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

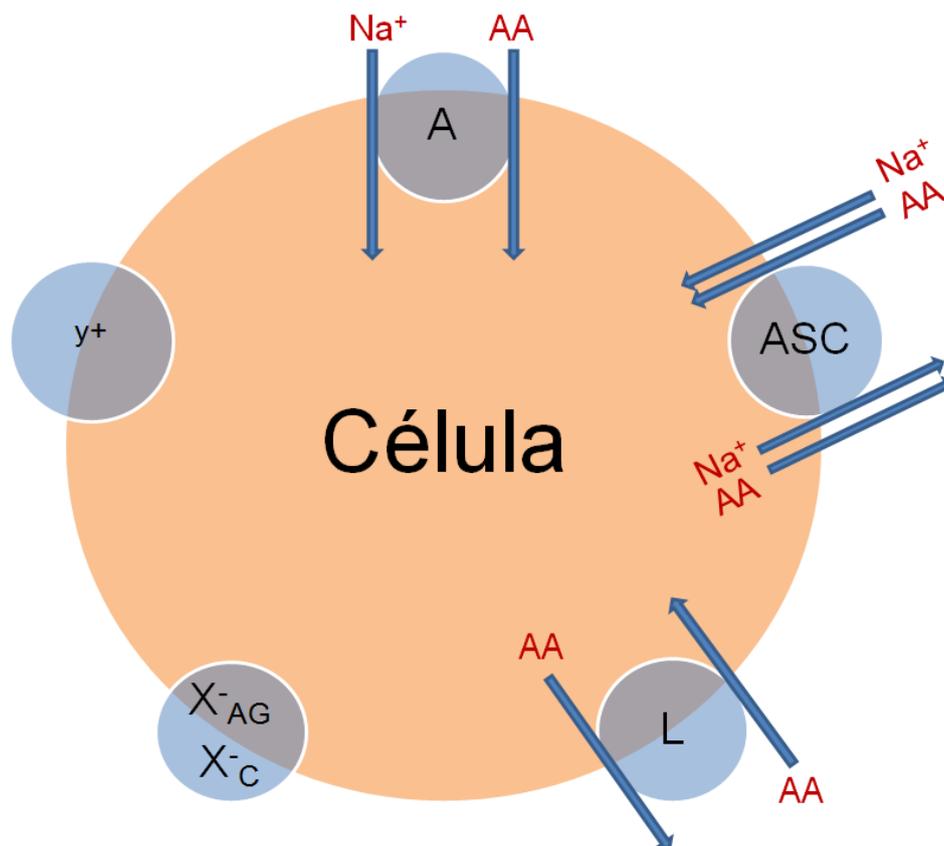


Figura 2 – Sistemas de transporte de aminoácidos nas células de invertebrados e de vertebrados (GUIDOTTI & GAZZOLA, 1992).

O estudo desses transportadores mediante a utilização de análogos não metabolizáveis, possibilitou o entendimento de quais sistemas estão envolvidos no transporte de diferentes tipos aminoácidos e em diferentes tecidos (CHRISTENSEN & CULLEN, 1968). Por exemplo, Schein et al. (2005),

ao investigarem a captação de ^{14}C -MeAIB no hepatopâncreas e no músculo mandibular do caranguejo *N. granulata*, verificaram que a captação deste análogo, utilizado para estudar a captação via sistema A, aumentou após 24 e 144 horas de estresse hiperosmótico no hepatopâncreas e no músculo mandibular, respectivamente. Estudos realizados por Péqueux et al., (1979), demonstraram que a quantidade de proteínas presentes na hemolinfa pode ser muito diferente de uma espécie para outra, mesmo quando os animais são mantidos em condições semelhantes de salinidade, com os valores variando de 34g/l em *Eriocheir sinensis* para 222 g/l em *Uca minax*. Schein et al., (2005) observaram que caranguejos submetidos tanto ao estresse hipo quanto ao hiperosmótico apresentam uma capacidade reduzida de oxidação da alanina no hepatopâncreas de caranguejos submetidos a diferentes tempos de estresse (24, 72, 144 h) e que essa foi mais pronunciada no estresse hiposmótico, sugerindo que a baixa oxidação deste aminoácido estaria envolvido na sua utilização na via gliconeogênica, tendo em vista que este é o tecido em que ela se mostra mais pronunciada (OLIVEIRA & DA SILVA, 2000).

A gliconeogênese é uma via que está bem conservada ao longo da evolução e é de grande importância na manutenção da homeostase da glicose, sendo os tecidos hepático, renal e intestinal os responsáveis pela produção de glicose (NELSON & COX, 2011; MOON, 1988). Ela consiste numa reversão parcial da via glicolítica, onde os substratos como aminoácidos tissulares, o lactato proveniente do metabolismo anaeróbico e o glicerol oriundo da degradação de triglicerídeos, são convertidos em glicose, dada a importância desta hexose como substrato primário de energia para alguns tecidos (VERRI et al., 2001). Nesta rota, a primeira etapa necessária à síntese de novo de

glicose é a carboxilação do piruvato a oxalacetato, reação esta catalisada pela piruvato carboxilase. Logo, o oxalacetato é transportado para fora da mitocôndria dando origem ao fosfoenolpiruvato (PEP), reação esta catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxinase (PEPCK). Após esta etapa, o PEP é convertido à frutose-6-fosfato pela frutose-1,6-bifosfatase e por fim, convertido em glicose pela glicose-6-fosfatase (NELSON & COX, 2011).

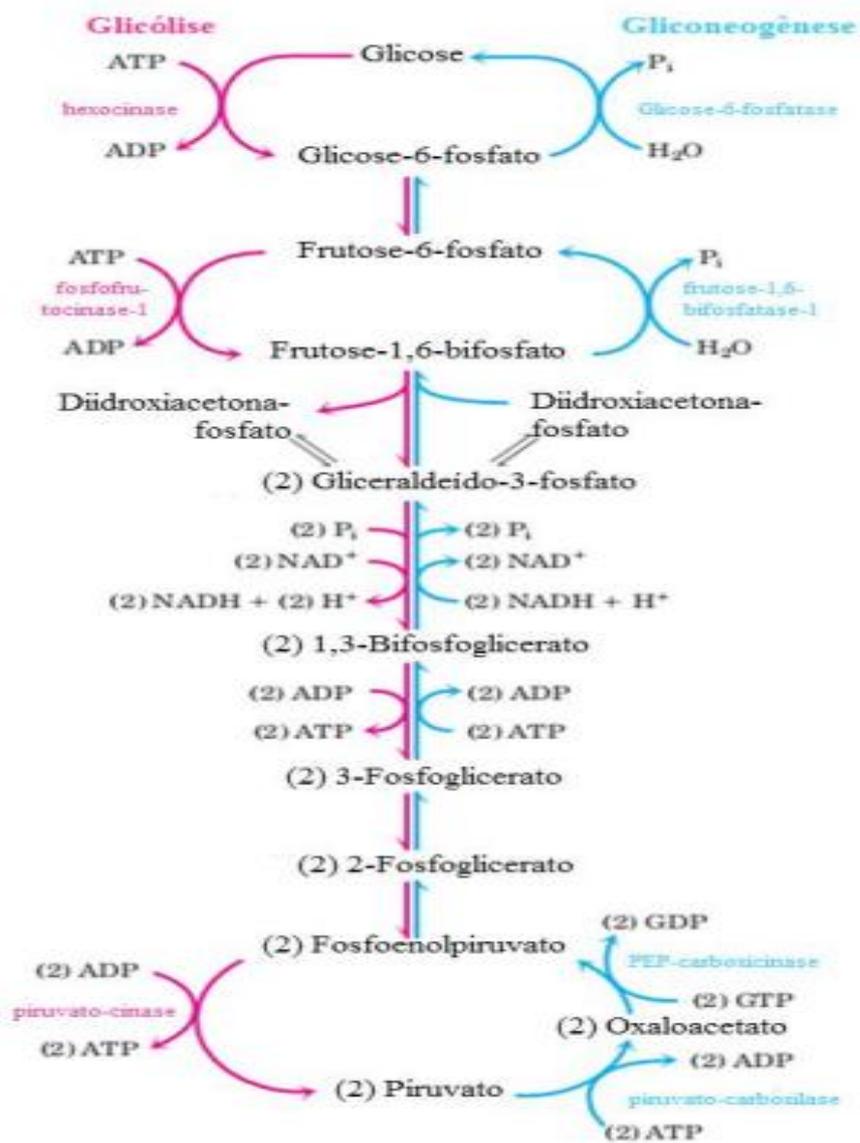


Figura 3 – Esquema das vias glicolítica e da via gliconeogênica (NELSON & COX, 2011).

O principal aminoácido na gliconeogênese hepática em humanos é a alanina (FELIG, 1975), embora outros autores considerem a glutamina (NURJHAN et al., 1995), por sustentarem a hipótese de que ele é o principal aminoácido liberado da musculatura esquelética durante o jejum e que o rim utiliza-o preferencialmente para a síntese de glicose.

Diversos estudos realizados em nosso laboratório com o caranguejo *N. granulata*, também demonstraram a participação da via gliconeogênica no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias nos ajustes metabólicos das concentrações de aminoácidos intracelulares em respostas aos estresses hipo e hiperosmótico (CHITTÓ et al., 2009, SCHEIN et al., 2005; 2004, OLIVEIRA & DA SILVA, 2000).

A variação sazonal da concentração de carboidratos em diferentes tecidos do *N. granulata* parece interferir na sua capacidade osmorreguladora. No verão, após o choque hiposmótico ou hiperosmótico, os níveis de carboidratos aumentaram em quase todos os tecidos estudados por Nery e Santos (1993), sugerindo a ativação da via gliconeogênica. Contudo, no inverno, em ambos os tipos de estresse osmótico, ocorreu mobilização de carboidratos somente nas brânquias (NERY & SANTOS, 1993). Em outro estudo, durante o processo de aclimação ao estresse hiperosmótico, observado entre os animais de inverno e de verão, foi verificada diferença no padrão de resposta gliconeogênica nas brânquias (CHITTÓ et al., 2009).

Schein et al. (2005a) verificaram que no verão a atividade gliconeogênica no músculo mandibular do *N. granulata* diminuiu após 24 horas de estresse hiperosmótico e a atividade da PEPCK diminuiu na fração mitocondrial e aumentou na fração citosólica. No entanto, após 72 horas de

choque hiperosmótico, foi constatado um aumento na atividade gliconeogênica, possivelmente, devido a um aumento na expressão gênica da PEPCK ocorrido às 24 horas de estresse osmótico. No inverno, durante o choque hiposmótico, a capacidade gliconeogênica e a atividade da PEPCK foram reduzidas e a expressão gênica da enzima achava-se extremamente baixa. Esses dados demonstraram que a via gliconeogênica muscular está envolvida nos ajustes metabólicos de aclimação aos meios hiposmótico ou hiperosmótico e pode ser modulada conforme a estação do ano (SCHEIN et al., 2005a).

Durante o estresse hiposmótico, em animais alimentados com as dietas rica em carboidratos (HC) ou rica em proteínas (HP), os valores de glicose circulante aumentaram. Os animais que receberam uma dieta HC apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de glicogênio hepatopancreático e muscular. Entretanto, no grupo que recebeu a dieta HP, o conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas aumentou e no músculo permaneceu inalterado após 72 horas de estresse hiposmótico, reforçando o possível envolvimento da via gliconeogênica (DA SILVA & KUCHARSKI, 1992).

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática na aclimação ao estresse hiposmótico no caranguejo *N. granulata*. Animais alimentados com dieta HP e submetidos ao estresse hiposmótico, durante um período de 144 horas, apresentaram um aumento na capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -alanina após 72 horas de estresse. Nos animais submetidos a uma dieta HC o aumento na capacidade gliconeogênica somente foi verificado às 144 horas de estresse. Porém, quando o substrato utilizado era o ^{14}C -lactato, ambos os grupos apresentaram uma redução na capacidade gliconeogênica a partir de 72 horas

de estresse hiposmótico. Esses dados sugerem que a gliconeogênese hepatopancreática está envolvida no ajuste metabólico de aminoácidos durante o estresse hiposmótico. Rosas et al. (2001), verificaram que o camarão *Litopenaeus vannamei* quando aclimatado a baixas salinidades também apresentava um aumento da atividade da PEPCCK no hepatopâncreas.

Schein et al., (2005) verificaram em *N. granulata* submetidos ao estresse hiperosmótico uma diminuição da concentração hemolinfática de glicina, sugerindo que este aminoácido seria captado pelos tecidos com o objetivo de aumentar a concentração intracelular de efetores osmóticos. No músculo e no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata*, submetidos ao estresse hiperosmótico, a captação de aminoácidos aumentou após 24 e 144 horas de estresse.

Trabalhos realizados com esse caranguejo também demonstraram a mobilização de reservas lipídicas teciduais durante o processo de aclimação ao meio hipo ou hiperosmótico, sugerindo que os lipídeos seriam uma importante fonte de energia durante o esforço osmorregulador nesse caranguejo (LUVIZZOTTO-SANTOS et. al., 2003). Martins et al. (2011) ao investigarem a participação da via lipogênica em *N. granulata* observaram um aumento na síntese de lipídeos a partir de aminoácidos nas brânquias (anteriores e posteriores) e no hepatopâncreas de animais expostos ao meio hiperosmótico.

Bock (2005) investigou o efeito do estresse osmótico, *in vitro*, sobre o metabolismo de aminoácidos nos tecidos de *N. granulata*. Os resultados mostram que o controle da síntese de proteínas parece estar envolvido no ajuste metabólico da concentração intracelular de aminoácidos no

hepatopâncreas, no músculo mandibular e nas brânquias submetidos à alteração osmótica aguda, *in vitro*. Por outro lado, durante o estresse hiposmótico agudo, *in vitro*, a diminuição da captação de aminoácidos via sistema A e o aumento da oxidação de ^{14}C -leucina foram usados como mecanismos para reduzir as concentrações intracelulares de aminoácidos nas brânquias anteriores e posteriores, respectivamente.

Como exposto acima, em nosso laboratório demonstramos que as vias gliconeogênica e lipogênica e a captação e a oxidação de aminoácidos estão envolvidas na regulação de aminoácidos intracelulares em resposta ao estresse osmótico *in vivo*. A hipótese desse trabalho foi investigar durante o estresse osmótico *in vitro*, quando o aporte de substrato, as ações hormonais e nervosa não estão interferindo, como a síntese de proteínas, a captação e a oxidação de aminoácidos estariam sendo utilizadas em resposta à alteração do volume celular induzida pelo estresse osmótico.

2. OBJETIVO GERAL

Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse osmótico agudo (hipo e hiperosmótico), *in vitro*, sobre as sínteses de glicose e de glicogênio e a formação de lipídios a partir de ^{14}C -alanina em diferentes tecidos de caranguejos *Neohelice granulata*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as capacidades gliconeogênica e glicogênica a partir de ^{14}C -alanina no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores, durante o estresse osmótico, *in vitro*, por 60 minutos.

Avaliar a capacidade lipogênica a partir de ^{14}C -alanina no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores, durante o estresse osmótico, *in vitro*, por 60 minutos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados caranguejos *Neohelice granulata* (DANA, 1851) (Crustacea, Brachyura, Varunidae) machos no estágio C do ciclo intermuda (DRACH & TCHERNIGOVITZEFF, 1967), a fim de minimizar os efeitos dos períodos de ecdise. Os animais foram coletados de acordo com as leis ambientais brasileiras (Portaria no. 332/90 IBAMA) as margens da Lagoa Tramandaí, no município de Imbé - RS, durante os meses de primavera e de verão. A captura foi realizada manualmente e o acondicionamento foi feito em caixas plásticas, com água do próprio local, durante o transporte até o laboratório, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde-ICBS na UFRGS, em Porto Alegre - RS.

No laboratório, os caranguejos foram submetidos ao choque hiposmótico com água destilada por 24 horas, com o objetivo de eliminar possíveis parasitas e limpar o conteúdo estomacal (KUCHARSKI, 1991). Após esse procedimento os animais foram transferidos para aquários contendo água com salinidade de 20‰, temperatura de 25°C, fotoperíodo natural e aeração constante. Os caranguejos foram alimentados, *ad libitum*, com carne bovina crua, duas vezes na semana.

3.2. Procedimentos experimentais

Após o período de aclimação ao laboratório os animais foram transferidos para aquários contendo a salinidade de 20‰ e então alimentados diariamente com carne bovina crua até o dia do experimento.

Para isso, no dia do experimento, os caranguejos foram crioanestesiados e amostras de hepatopâncreas (150mg) e de brânquias anteriores e posteriores (50-100mg de cada) foram coletadas e colocadas em placas de Petry sobre gelo, contendo a solução fisiológica controle de caranguejo (SFC). Foram realizados pequenos cortes nas lamelas branquiais, de modo a possibilitar um maior contato do tecido com o meio de incubação.

3.3. Determinação da conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose

As amostras de tecidos foram colocadas em tubos de 2ml contendo 1ml de SFC com diferentes osmolalidades segundo o grupo experimental:

Grupo controle: 374mM de NaCl, 10mM de KCl, 25mM CaCl_2 , 10mM de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8,8mM H_3BO_3 , 10mM HEPES e 0,1mM fluoreto de fenilmetisulfonil (PMSF), pH 7,8, 770 mOsm/kg. A osmolalidade da hemolinfa dos animais aclimatados à salinidade de 20‰ é de $719 \pm 10,41$ mOsm/kg.

Grupo hiposmótico: 331mM de NaCl, 10mM de KCl, 25mM CaCl_2 , 10mM de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8,8mM H_3BO_3 , 10mM HEPES e 0,1mM fluoreto de fenilmetisulfonil (PMSF), pH 7,8, 690 mOsm/kg. A osmolalidade da hemolinfa dos animais aclimatados à salinidade de 0‰ é de $636 \pm 21,05$ mOsm/kg.

Grupo hiperosmótico: 457mM de NaCl, 10mM de KCl, 25mM CaCl_2 , 10mM de $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 8,8mM H_3BO_3 , 10mM HEPES e 0,1mM fluoreto de fenilmetisulfonil (PMSF), pH 7,8, 900 mOsm/kg. A osmolalidade da hemolinfa dos animais aclimatados à salinidade de 20‰ é de $853 \pm 12,45$ mOsm/kg.

Para a determinação da síntese de glicose a partir de ^{14}C -alanina, amostras de hepatopâncreas e de brânquias (anteriores e posteriores) foram excisadas e fatiadas em placas de Petry mantidas sobre o gelo e umedecidas

com SFC controle. O tecido foi colocado em tubos com capacidade para 2ml contendo 1ml de SFC correspondente ao estresse e, então, foi realizada uma pré-incubação de 15 minutos com o intuito de eliminar qualquer fator que pudesse interferir na síntese de glicose como a ligação de algum hormônio ao seu receptor. Após a pré-incubação os tubos contendo os respectivos tecidos foram colocados imediatamente em gelo e então posteriormente foram secos em papel filtro e transferidos para tubos de 2ml contendo SFC para cada estresse, mais 0,15 μ Ci de 14 C-alanina (Amersham Life Science) e 5mM de alanina não marcada.

A seguir os tubos foram aerados com carbogênio ($O_2:CO_2$, na proporção de 95:5% v/v) durante 20 segundos, tampados e submetidos à incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff durante 60 minutos, com agitação constante e temperatura de 25°C. Transcorrido esse período, as reações teciduais foram interrompidas mediante a imersão dos tubos em gelo e as amostras dos tecidos foram para a posterior determinação da síntese de 14 C-glicogênio. O meio de incubação foi centrifugado a 4000rpm durante 2 minutos e 300 μ l do sobrenadante transferidos para tubos contendo 75 μ l de $Ba(OH)_2$ saturado e 75 de $ZnSO_4$ a 2% para a desproteínização (SOMMOGY, 1945). Em seguida realizou-se nova centrifugação a 6000rpm durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da síntese de glicose a partir de 14 C-alanina.

A quantificação da 14 C-glicose foi realizada por meio da técnica de cromatografia em camada delgada, realizada em placas de alumínio com sílica gel 60G – (MERCK), conforme método descrito por Baker et al. (1965).

Como solução carreadora foi utilizada 200ml de uma mistura de solvente constituída de N-butanol : álcool etílico 95% : ácido acético 5,4%, na proporção de 500:316:184 (v/v/v). A atmosfera da cuba utilizada era totalmente saturada com esta solução carreadora. O espaço disponível para o solvente correr na placa era delimitado a toda extensão da placa a partir do ponto de origem, onde eram aplicadas as amostras. Neste ponto foram aplicadas 10 μ l da amostra juntamente com 10 μ l de solução padrão de glicose não marcada na concentração de 100mg/dl e 20 μ l dessa solução foram utilizados como controle. A glicose foi revelada nas placas de cromatografia com uma solução de: álcool etílico 95% : anisaldeído : ácido sulfúrico concentrado nas proporções de 18:1:1 (v/v/v). As bandas com aproximadamente 2cm eram recortadas e colocadas diretamente em frascos (vials) contendo 4ml de líquido de cintilação [Tolueno – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)]. As amostras permaneceram refrigeradas em temperatura média de 4°C por um período de 24 horas e, após esse período, a radioatividade foi determinada em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos como μ mol de ¹⁴C-alanina convertidos em ¹⁴C-glicose. g⁻¹de tecido.h⁻¹ de incubação.

3.4. Determinação da síntese de ¹⁴C-glicogênio a partir de ¹⁴C-alanina

A determinação do ¹⁴C-glicogênio seguiu o método descrito por Thomas et al. (1968) e posteriormente adaptado por Oliveira et al. (2000). As etapas iniciais que antecedem esse processo foram executadas como descritas nos procedimentos relacionados à determinação da gliconeogênese.

Os tecidos foram retirados dos tubos lavados em 5ml de SFC controle, hiposmótico ou hiperosmótico, secos em papel filtro e submetidos à digestão com 100µl de KOH (0,5N) em banho a 70°C durante 40 minutos. Após esse período, sucedeu-se a desproteinização e a neutralização do tecido com adição de 25µl de HCl (1N) e 25µl de TCA (30%). A seguir foi realizada uma centrifugação a 10000rpm durante 10 minutos e 30µl do sobrenadante de cada amostra foi aplicada em tiras de papel Whatman 3MM. Essas tiras foram submetidas à imersão sequencial por 2 períodos (30 e 15 minutos) em dois recipientes contendo álcool etílico (66%), promovendo assim, a precipitação do ¹⁴C-glicogênio.

Posteriormente, as tiras foram secas sobre papel filtro e colocadas em frascos (vials) contendo 4ml de líquido de cintilação [Tolueno – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e a radioatividade determinada em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos como µmol de ¹⁴C-alanina convertida em ¹⁴C-glicogênio. g⁻¹ de tecido.h⁻¹ de incubação.

3.5. Determinação da conversão de ¹⁴C-alanina em ¹⁴C-lipídeos

As etapas iniciais que antecedem esse processo foram executadas como descritas nos procedimentos relacionados à determinação da gliconeogênese.

Após a incubação, os tubos foram imediatamente colocados em gelo, para parar as reações bioquímicas, os tecidos lavados em 5 ml de SFC controle, hiposmótico ou hiperosmótico para retirar o excesso de material radioativo, e secos em papel filtro. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v), utilizando

um homogeneizador com pistilo de teflon, e armazenadas por no mínimo 2 dias para posterior extração dos lipídeos.

A extração dos lipídeos foi realizada conforme o método descrito por Folch et al. (1957). Às amostras filtradas foi adicionada solução de NaCl 0,9% na proporção de 5:1 (v/v). Após a centrifugação por 5 minutos a 1500rpm, a fase superior foi descartada e amostras de 2ml foram repassadas para tubos de vidro, que foram deixados em repouso dentro de uma capela de exaustão, a temperatura ambiente, até a evaporação completa da fase clorofórmica sob nitrogênio. Às amostras foram acrescentadas 5ml de líquido de cintilação [Tolueno – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)] e a radioatividade medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallac). Os resultados foram expressos em nmol de ^{14}C -alanina convertidos em ^{14}C -lipídeos totais.g⁻¹ de tecido.h⁻¹ de incubação.

3.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos desvio padrão da média (média \pm DPM). Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey para dados paramétricos e para dados não paramétricos realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Os testes foram realizados com o programa estatístico GraphPadPrism 5.

4. RESULTADOS

4.1. Estudo *in vitro* da incorporação de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicogênio no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico

No hepatopâncreas de caranguejos submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos não foram constatadas alterações significativas na conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose entre os grupos experimentais e o grupo controle, nem entre os estresses ($p>0,05$) (Fig. 4A).

O estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos não alterou significativamente a capacidade de síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -alanina no hepatopâncreas dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, nem entre os estresses ($p>0,05$) (Fig. 4B).

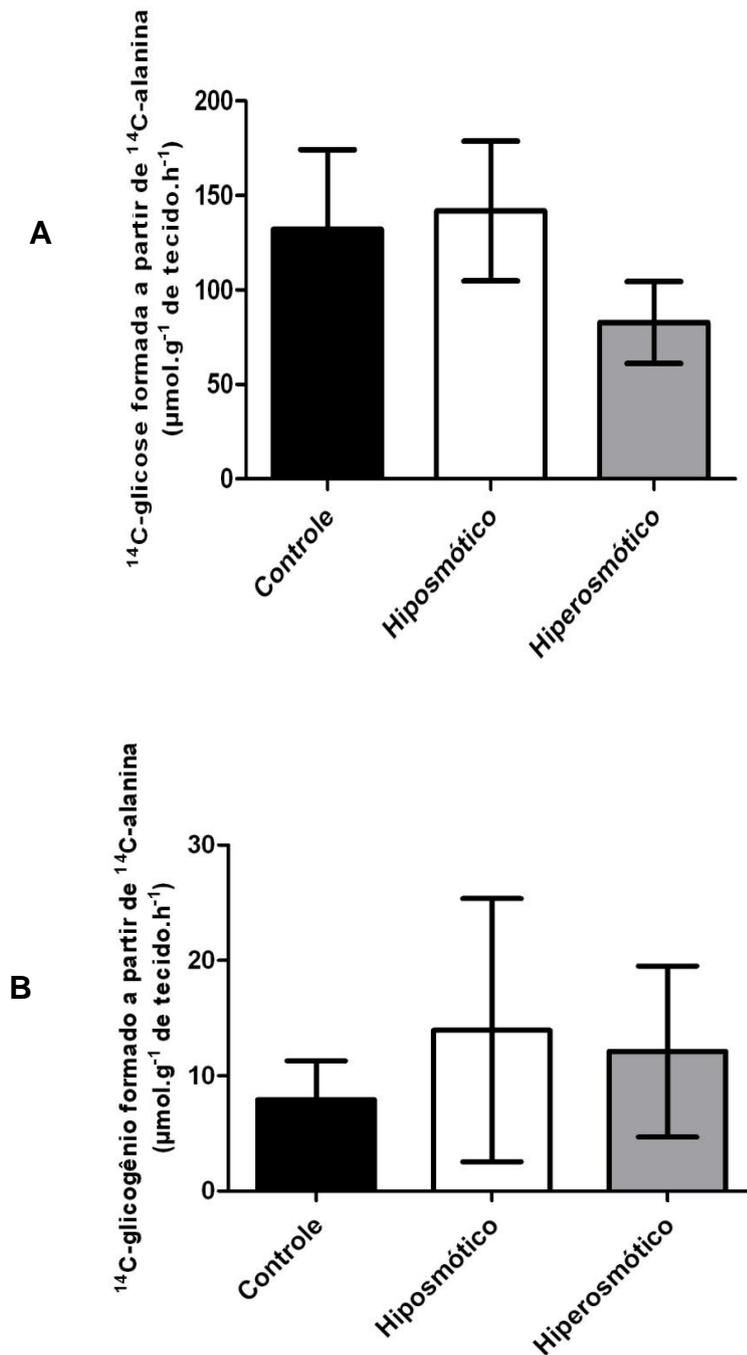


Figura 4: Efeito de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose (A) (n=8-16) e sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicogênio (B) (8-16) no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM.

4.2. Estudo *in vitro* da incorporação de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose e ^{14}C -glicogênio nas brânquias anteriores de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico

Nas brânquias anteriores de caranguejos submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico por 60 minutos não foram constatadas alterações significativas na conversão de ^{14}C -alanina a ^{14}C -glicose entre os grupos experimentais e o grupo controle, nem entre os estresses ($p>0,05$) (Fig. 5A).

O estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos não alterou significativamente a capacidade de síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -alanina nas brânquias anteriores dos grupos experimentais quando comparados ao grupo controle, nem entre os estresses ($p>0,05$) (Fig. 5B).

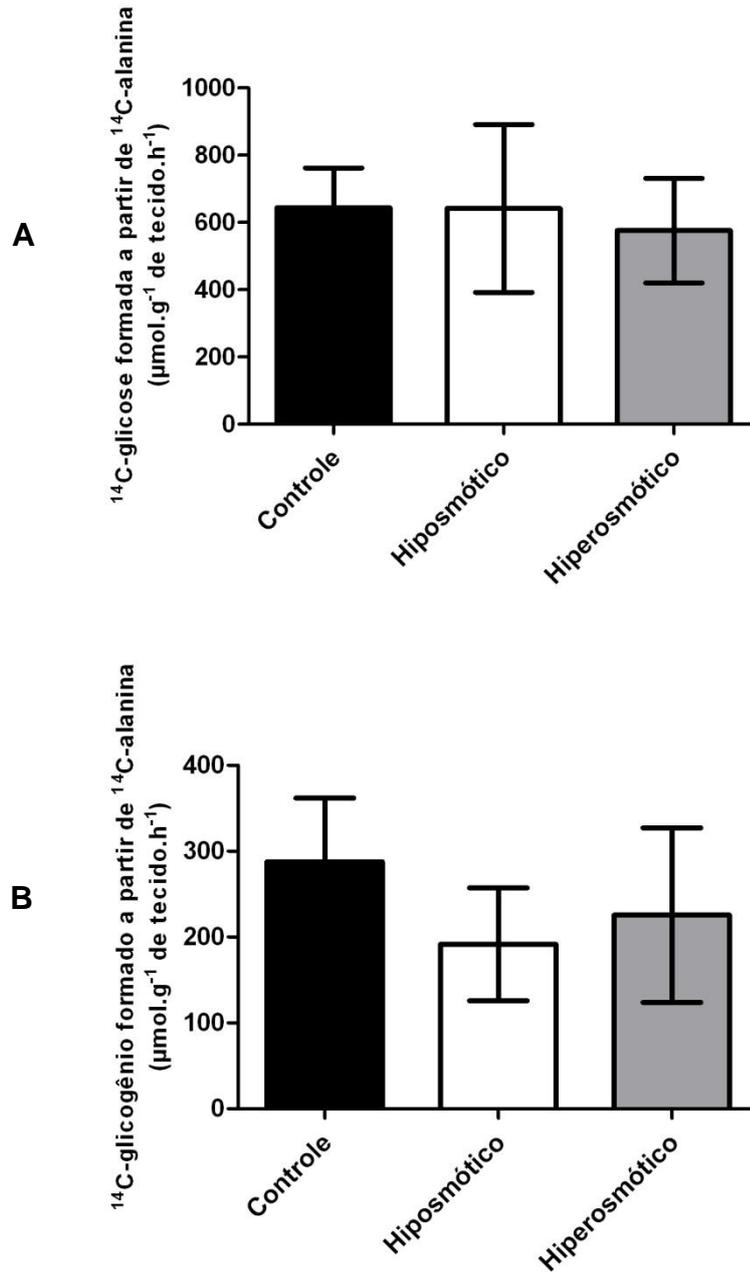


Figura 5: Efeito de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose (A) ($n=8-16$) e sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicogênio (B) ($8-16$), nas brânquias anteriores de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM.

4.3. Estudo *in vitro* da incorporação de ¹⁴C-alanina em ¹⁴C-glicose e ¹⁴C-glicogênio nas brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico

Nas brânquias posteriores de caranguejos submetidos a 60 minutos de estresse hiposmótico, *in vitro*, não foram constatadas alterações significativas na síntese de ¹⁴C-glicose a partir da ¹⁴C-alanina quando comparada com aquela do grupo controle (Fig. 6A). Entretanto, quando os caranguejos foram submetidos ao estresse hiperosmótico, *in vitro*, a capacidade gliconeogênica diminuiu 50% ($p < 0,05$), quando comparada aquelas dos grupos controle e hiposmótico (Fig. 6A).

A síntese de ¹⁴C-glicogênio nas brânquias posteriores não alterou após 60 minutos de estresse osmótico, *in vitro*, quando comparada aquela do grupo controle ($p > 0,05$) (Fig. 6B).

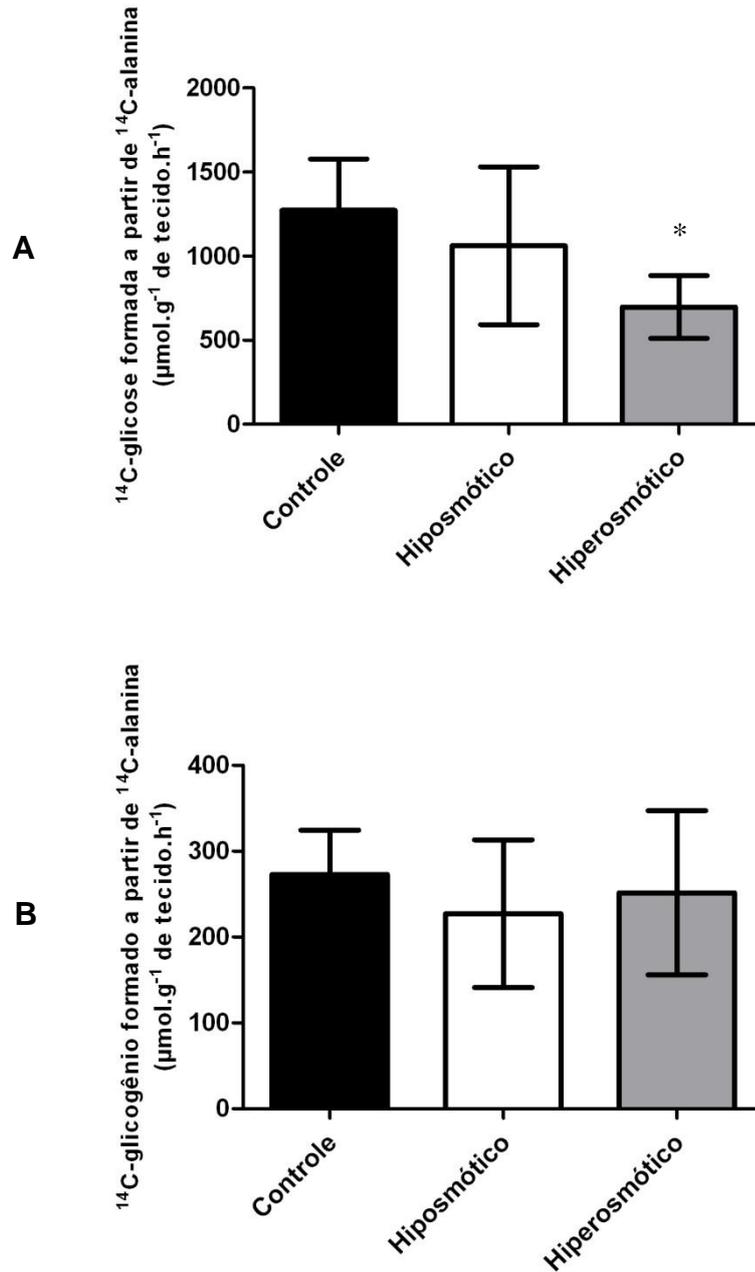


Figura 6: Efeito de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico sobre a conversão de ¹⁴C-alanina em ¹⁴C-glicose (A) (n=8-16) e sobre a conversão de ¹⁴C-alanina em ¹⁴C-glicogênio (B) (8-16), nas brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DPM.

*- valores médios diferentes do grupo controle (p<0,05).

4.4. Estudo *in vitro* da incorporação de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídio no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico

No hepatopâncreas de caranguejos submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos não foram constatadas alterações significativas na conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídios entre os grupos experimentais e o grupo controle, nem entre os estresses ($p > 0,05$) (Fig. 7A).

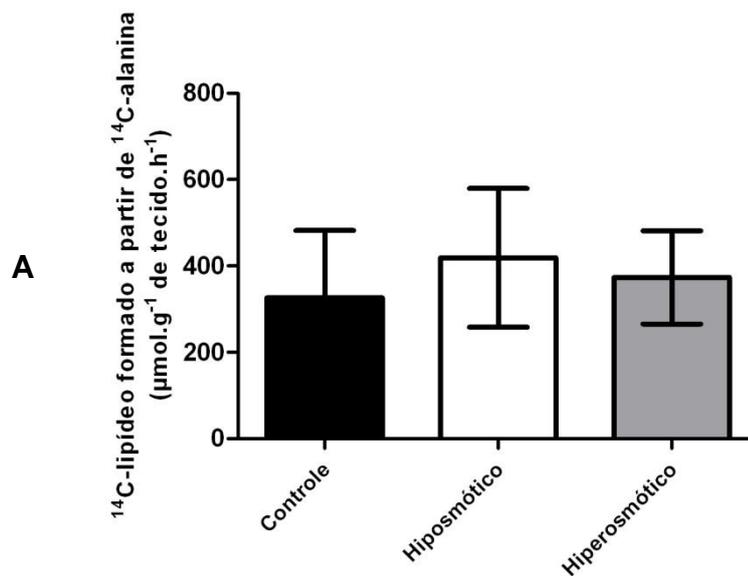


Figura 7A: Efeito de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídeo (8-16), no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM.

4.5. Estudo *in vitro* da incorporação de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídio nas brânquias anteriores de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico

Nas brânquias anteriores de caranguejos submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos foi constatado uma alteração significativa na conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídios entre o grupo hiperosmótico e controle ($p < 0,05$) (Fig. 8A).

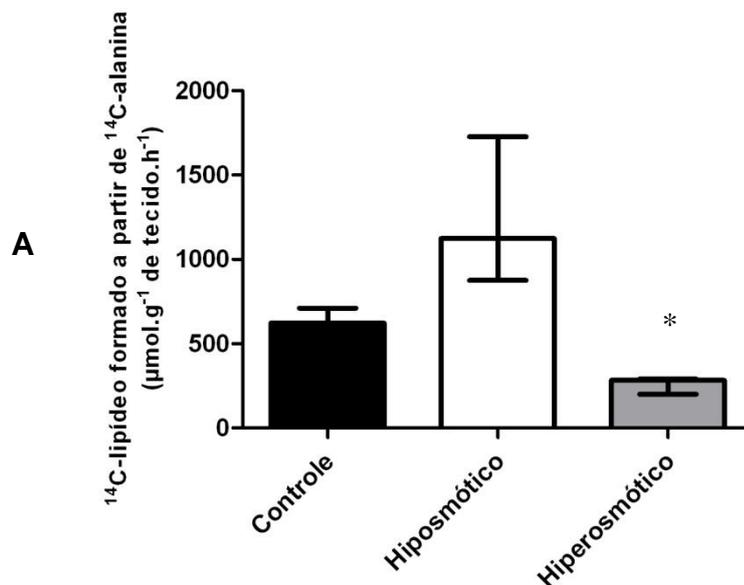


Figura 8A: Efeito de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídeo (8-16), nas brânquias anteriores de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM.

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

4.5. Estudo *in vitro* da incorporação de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídio nas brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico.

Nas brânquias posteriores de caranguejos submetidos ao estresse hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos foi constatado um aumento significativo na conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídios entre o grupo hiposmótico e controle, e uma diminuição significativa entre os estresses (p<0,05) (Fig. 9A).

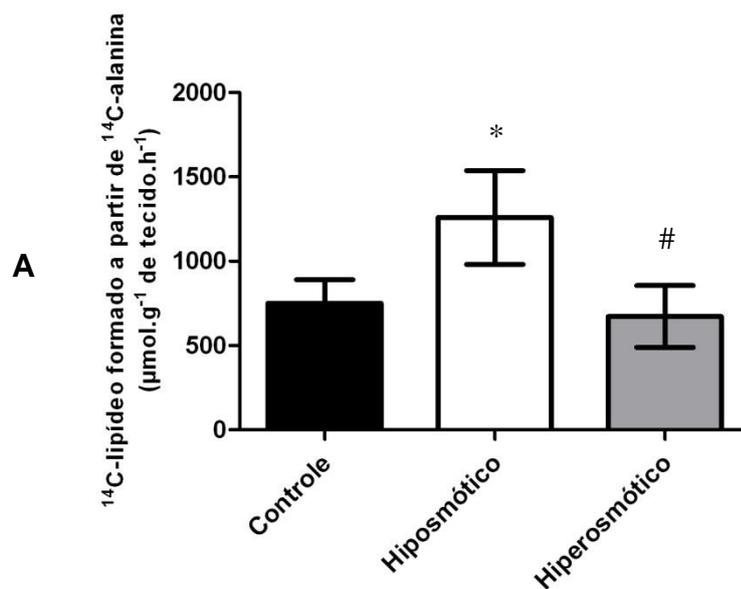


Figura 9A: Efeito de 60 minutos de estresse hipo ou hiperosmótico sobre a conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -lipídeo (8-16), nas brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DPM.

*- valores médios diferentes do grupo controle (p<0,05).

#_ valores médios diferentes entre os grupos experimentais (p<0,05).

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi determinar o fluxo de carbonos da alanina entre as vias gliconeogênica, glicogênica e lipogênica, no hepatopâncreas e nas brânquias (anteriores e posteriores), em resposta aos ajustes resultantes da regulação isosmótica, responsável pela composição do fluido intracelular e pelo volume celular, no estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*. Os resultados demonstram que o estresse osmótico agudo, *in vitro*, modula a capacidade intrínseca de incorporação dos carbonos da alanina em glicose, glicogênio e lipídios totais nas brânquias anteriores e posteriores de *N granulata*.

As células de mamíferos submetidas ao choque hiposmótico aumentam de volume e, dentro de minutos, retornam parcialmente ao seu volume inicial. Esse comportamento foi denominado de redução do volume celular regulatório (RVD). Inversamente, a exposição ao meio hiperosmótico reduz o volume celular e, após poucos minutos, ocorre aumento regulatório do volume (RVI), retornando o volume aos valores iniciais. Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou pelo RVI podem diferir entre os diferentes tipos de células, mas em geral envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons e de solutos orgânicos através da membrana plasmática e ativação ou inibição de vias metabólicas celulares (LANG et al., 1998; HÄUSSINGER et al., 1994).

Em invertebrados, diversos estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado que durante o estresse hiperosmótico, a concentração intracelular de aminoácidos livres aumenta, enquanto durante o estresse hiposmótico, a concentração intracelular de aminoácidos livres diminui (GILLES, 1997).

Estudos realizados por Freire et al. (2008) demonstraram em crustáceos de água doce, de estuário e de água salgada (mar) que o choque osmótico, *in vitro*, por 15 a 120 minutos, altera o peso do tecido muscular. Os autores constataram diminuição significativa no peso do tecido durante o choque hiperosmótico e um marcante aumento de peso no choque hiposmótico.

O *Neohelice granulata* é um caranguejo eurialino que vive nas zonas intertidal e supralitoral dos estuários da costa sul do Brasil onde está exposto a diferentes desafios ambientais como variações na temperatura, no fotoperíodo, na pressão parcial de O₂, na disponibilidade e na composição de alimento e na salinidade da água (TURCATO, 1990; KUCHARSKI e DA SILVA, 1991; NOVO et al., 2005; BIANCHINI et al., 2008; VALLE et al., 2009). Este caranguejo é classificado como regulador hiper-hiposmótico eurialino, suportando variações de osmolalidade do meio de 96 - 529 mOsm/Kg de H₂O na primavera e no verão, respectivamente (BIANCHINI et al., 2008; VALLE et al., 2009). No inverno, a osmolalidade da hemolinfa é mais alta, 967±85 mOsm/Kg de H₂O, no verão e no outono é mais baixa, 833±122 mOsm/Kg de H₂O (VALLE et al., 2009).

In vivo, a participação dos sistemas endócrino e nervoso na resposta ao estresse osmótico sugere a presença de um controle neuroendócrino sobre a osmorregulação em crustáceos (FREIRE et al., 1995; ECKHARDT et al., 1995). Desta forma, o estudo do choque osmótico, *in vitro*, possibilita separar as influências dos sistemas nervoso, endócrino e neuroendócrino sobre a osmorregulação.

Em nosso trabalho os tecidos eram isolados de animais mantidos em condições controladas de laboratório e submetidos ao estresse osmótico *in vitro*. Desta forma não sofriam as variações ambientais, bioquímicas e fisiológicas próprias do estresse osmótico na natureza ou *in vivo* no laboratório.

O estresse hiposmótico, *in vitro*, por 60 minutos não alterou a síntese de glicose, de glicogênio e de lipídios totais a partir da ¹⁴C-alanina no hepatopâncreas de *N. granulata*. Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram que nesse caranguejo, o estresse hiposmótico, *in vitro*, não altera significativamente a captação de aminoácidos via sistema A no hepatopâncreas (BOCK, 2005). Entretanto, esta mesma autora demonstrou que no hepatopâncreas de *N. granulata*, 60 minutos de estresse hiposmótico, *in vitro*, estimularam a síntese de proteínas a partir de ¹⁴C-leucina (BOCK, 2005). Estes achados explicam, em parte, os resultados obtidos neste trabalho. É possível que a diminuição da concentração intracelular de aminoácidos durante o estresse hiposmótico, *in vitro*, ocorra via aumento da síntese de proteínas, ao contrário do que foi constatado *in vivo* por Oliveira e Da Silva (2000) e Schein et al. (2005) que demonstraram que a gliconeogênese é uma das rotas envolvidas no ajuste metabólico da concentração de aminoácidos livres intracelularmente. Os aminoácidos seriam deaminados e as cadeias de carbono utilizadas como substrato para a gliconeogênese nos tecidos hepatopancreático e muscular. Martins et al. (2011) constataram em caranguejos *N. granulata* um aumento gradual na atividade da enzima PEPCK no hepatopâncreas ao longo das 144h de estresse hiposmótico, *in vivo*, confirmando a participação da via gliconeogênica na regulação da concentração intracelular de aminoácidos neste tecido. Da Silva e Kucharski

(1992) também constataram significativo aumento da concentração de glicogênio no hepatopâncreas de *N. granulata* submetido ao estresse hiposmótico, *in vivo*, o que indica que a glicose formada pela via gliconeogênica foi armazenada na forma de glicogênio neste tecido. Em hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata* submetidos, *in vivo*, ao estresse hiposmótico a captação de [1-¹⁴C]-ácido metil aminoisobutírico (¹⁴C-MeAIB) não foi alterada, contudo, a formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-alanina diminuiu gradativamente durante às 144h de estresse osmótico (SCHEIN et al., 2005). Estes resultados sugerem que exista um controle neuroendócrino como indicado pelos diferentes resultados encontrados em estudos onde o estresse osmótico foi realizado, *in vivo* (MORRIS ET al., 2001), como também reforçam a participação da síntese de proteínas e da via gliconeogênica como vias preferenciais para a redução da concentração de aminoácidos intracelulares no hepatopâncreas de *N. granulata* durante o estresse hiposmótico (BOCK, 2005).

Segundo a literatura consultada, as brânquias anteriores dos caranguejos eurialinos estão envolvidas com as trocas de gases e as brânquias posteriores com a osmorregulação, entre outras funções (GENOVESE et al., 2000; LUQUET et al., 2000). Ambas as brânquias estão em contato direto com a água dentro da câmara branquial enfrentando, assim, as variações diárias de salinidade do meio externo.

Os resultados do presente trabalho mostram que o estresse hiposmótico, *in vitro*, não alterou significativamente a incorporação do ¹⁴C-alanina em glicose, glicogênio e lipídios totais nas brânquias anteriores de *N. granulata*. Em brânquias posteriores de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hiposmótico, *in vivo*, foi observada uma diminuição significativa na

incorporação de ^{14}C -alanina em glicose e aumento na capacidade de síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina nas brânquias (CHITTÓ 2000; MARTINS et al., 2011). Entretanto, em brânquias posteriores, o mecanismo utilizado para reduzir as concentrações intracelulares de aminoácidos durante o estresse hiposmótico, *in vitro*, foi a diminuição significativa na capacidade de captação de aminoácidos e aumento da síntese de proteínas (BOCK, 2005).

Nas brânquias anteriores, o presente estudo demonstra que houve uma tendência a um aumento da capacidade de síntese de lipídios totais a partir de ^{14}C -alanina, porém as sínteses de glicose e de glicogênio não foram alteradas neste tecido pelo estresse hiposmótico, *in vitro*. Estes achados, *in vitro*, confirmam os resultados, *in vivo*, obtidos por Martins et al. (2011). Estes autores constataram nas brânquias anteriores aumento da síntese de ^{14}C -lipídios totais a partir de ^{14}C -glicina e da atividade da enzima PEPCK, sugerindo a participação da via gliceroneogênica na regulação da concentração intracelular de aminoácidos durante a resposta ao estresse hiposmótico. Oliveira e Da Silva (2000) também demonstraram aumento na concentração de uréia na hemolinfa de caranguejos *N. granulata* submetidos ao estresse hiposmótico, *in vivo*, sugerindo um aumento do catabolismo de aminoácidos, e, concomitantemente, uma diminuição na concentração intracelular destes substratos durante o ajuste ao estresse hiposmótico.

Alterações no influxo de aminoácidos, no catabolismo e na síntese de proteínas ou na oxidação de aminoácidos a $^{14}\text{CO}_2$ estão envolvidas na regulação intracelular destes osmólitos durante o processo de aclimação ao estresse hiperosmótico em tecidos de invertebrados (GILLES, 1998).

Em hepatopâncreas de *N. granulata* exposto ao estresse hiperosmótico, *in vivo*, Schein et al. (2005) demonstraram que a captação de ^{14}C -MeAIB aumentou em 41%. Além disso, a concentração hemolinfática de glicina durante o estresse hiperosmótico diminuiu 60% neste caranguejo (SCHEIN, 1999). Entretanto, os autores constataram neste tecido, que a oxidação da ^{14}C -alanina sofreu redução marcante ao longo das 144h de estresses hiperosmótico, *in vivo*. Recentemente, Martins et al. (2011) demonstraram que a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina aumenta marcadamente no hepatopâncreas de *N. granulata* submetido por 72h ao estresse hiperosmótico, *in vivo*, quando ocorre uma redução marcante das reservas de lipídios totais neste tecido (CHITTÓ et al., 2009), provavelmente, o incremento na síntese de lipídios seja para repor as reservas de lipídios utilizados como substrato energético no esforço de osmorregulação. No presente estudo, o estresse hiperosmótico, *in vitro*, não alterou significativamente as capacidades de síntese de glicose, de glicogênio e de lipídios a partir de ^{14}C -alanina no hepatopâncreas de *N. granulata*. Entretanto, Boch (2005) utilizando o mesmo protocolo experimental e a mesma espécie animal, observou diminuição marcante da síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, mas sem alteração marcante na captação de ^{14}C -MeAIB no hepatopâncreas. Esses achados demonstram que a diminuição na capacidade de síntese de proteínas seria uma estratégia para aumentar a concentração intracelular de aminoácidos durante o estresse hiperosmótico, *in vitro*, sem a necessidade de diminuir a capacidade de síntese das vias gliconeogênica, glicogênica, lipogênica e nem o influxo de aminoácidos nas células hepatopancreáticas.

O estresse hiperosmótico, *in vitro*, diminuiu marcadamente a capacidade de síntese de glicose comparada ao grupo controle nas brânquias posteriores e, de lipídios totais neste mesmo tecido em relação ao grupo hiposmótico, contudo, a glicogênese não foi alterada por este estresse osmótico. Estes achados são concordantes com os resultados obtidos por Chittó et al. (2009) que verificaram marcante redução da atividade gliconeogênica e da concentração de lipídios totais em brânquias posteriores de *N. granulata* submetidos ao estresse hiperosmótico, *in vivo*, por 72h. Entretanto, Martins et al. (2011) verificaram que após 72h de estresse hiperosmótico, *in vivo*, ocorreu aumento significativo da síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina nas brânquias posteriores e que este aumento coincide com uma diminuição marcante das reservas de lipídios totais. Provavelmente estes lipídios foram utilizados como substrato energético no processo de aclimação ao estresse osmótico (LUVIZZOTO-SANTOS et al., 2003; CHITTÓ et al., 2009). Bock (2005) verificou em brânquias posteriores de *N. granulata* marcante diminuição da capacidade de síntese de proteínas, entretanto, não constatou alteração significativa na captação de ^{14}C -MeAIB após o estresse hiperosmótico, *in vitro*, por 60 minutos. Estes achados mostram que a estratégia metabólica de resposta ao estresse hiperosmótico, *in vitro*, consiste na redução da capacidade de síntese de substratos energéticos a partir de aminoácidos, provavelmente, com o intuito de diminuir o gasto de ATP e de aumentar a concentração intracelular de aminoácidos necessário para a regulação do volume celular (GILLES, 1998). Devido a sua participação no processo de osmorregulação, as brânquias posteriores de *N. granulata* possuem a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e a sua afinidade por sódio

maiores que nas brânquias anteriores, envolvidas nas trocas gasosas entre o meio interno e o externo (CASTILHO et al. , 2001), o que leva ao gasto maior de energia neste tecido.

O estresse hiperosmótico, *in vitro*, não alterou de forma significativa a síntese de glicose, a glicogênese e a lipogênese a partir de ^{14}C -alanina em brânquias anteriores de *N. granulata*. Entretanto, o estresse hiperosmótico, *in vitro*, reduziu a incorporação do ^{14}C -leucina em proteínas em brânquias anteriores deste caranguejo (BOCK, 2005). *In vivo*, o estresse hiperosmótico também não alterou significativamente a síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicerol nem a concentração de lipídios totais em brânquias anteriores de *N. granulata* (CHITTÓ et al., 2009). Contudo, após 144h de estresse hiperosmótico, *in vivo*, Martins et al. (2011) constataram uma aumento da síntese de lipídios totais a partir de ^{14}C -glicina. Nas brânquias anteriores a estratégia de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico, *in vitro*, teria a participação da redução da síntese de proteínas para aumentar a concentração intracelular de aminoácidos e, assim, regular o volume celular.

O objetivo deste trabalho foi determinar se as vias gliconeogênica, glicogênica e a lipogênica a partir de aminoácidos estariam envolvidas na regulação da redução do volume celular regulatório (*regulatory cell volume decrease* - RVD), quando os tecidos fossem expostos ao meio hiposmótico ou, inversamente, com a exposição súbita ao meio hiperosmótico que leva a uma redução do volume celular e, após poucos minutos, ocorre aumento regulatório do volume (*volume regulatory increase* – RVI), retornando o volume aos níveis iniciais. Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou RVI podem apresentar variações segundo o tipo celular, mas em geral envolvem a ativação de

sistemas de transporte de íons e solutos orgânicos através da membrana plasmática (HÄUSSINGER et al., 1994). Além disso, as mudanças de volume celular modificam várias funções metabólicas. O aumento de volume celular favorece a síntese e inibe a degradação de proteínas, de glicogênio e, em menor extensão, de lipídios. A diminuição de volume celular tem efeito oposto. Assim, o aumento do volume celular causado pelo estresse hiposmótico pode ser considerado como um sinal anabólico, enquanto que a redução de volume favorece o catabolismo (LANG et al., 1998; HÄUSSINGER et al., 2004). Em invertebrados, Yancey et al. (1982) descreveram a importância dos solutos orgânicos, tais como, os aminoácidos como osmólitos que participam da regulação do volume celular via influxo ou efluxo através da membrana celular ou, ainda, via ativação ou inibição de diferentes vias metabólicas e, assim, controlando a concentração intracelular de aminoácidos em resposta ao estresse osmótico agudo.

Os resultados do presente trabalho mostram claramente que o fluxo de ^{14}C -alanina entre as vias gliconeogênica, glicogênica e liponênica no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores são controlados com o objetivo de aumentar ou diminuir os níveis de aminoácidos intracelulares para que a homeostase celular seja mantida e a *RVD* ou *RVI* ocorra adequadamente sem dano celular.

Em conclusão, o estresse osmótico, *in vitro*, isola as influências dos hormônios envolvidos com a osmorregulação, do sistema nervoso e do sistema neuroendócrino o que foi demonstrado neste trabalho quando os resultados obtidos, *in vitro*, foram comparados aqueles verificados *in vivo* demonstrando as variadas respostas do organismo como um todo e somente o tecido isolado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. Fisiologia. 4.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

BAKER, N.; HUEBOTTER, R. J.; SCHOTZ, M. C. Analysis of glucose-¹⁴C in tissues using thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, v. 10, p. 227-235, 1965.

BOND-BUCKUP, L.; FONTOURA, N. F.; MARRONI, N.; KUCHARSKI, L. C. O caranguejo – manual para o ensino prático em zoologia. Editora da Universidade, UFRGS, Porto Alegre, 71p.,1991.

BIANCHINI, A.; LAUER, M. M.; NERY, L. E. M.; COLARES, E. P.; MONSERRAT, J. M.; SANTOS, E. A. F. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 151, p. 423-436, 2008.

BOCK, C. Influência do estresse hipo e hiperosmótico na síntese e mobilização de proteínas, na captação e oxidação de aminoácidos em tecidos de *Chasmagnathus granulata*. Dissertação de Mestrado, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

BOTTO, J. L., IRIGOYEN, H. P. Bioecología de la comunidad Del cangrejal I. contribucion al conocimiento biológico delcangrejo de estuário, *Chasmagnathus*

granulatus Dana (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) em la desembocadura del rio Salado, província de Buenos Aires. Seminário Latinoamericanoem Ecologia Bentônica Y Sedimentologia de la Plataforma Continental del Atlântico Sur, UNESCO, Montivideo, Uruguay, 161-169, 1980.

BROMBERG, E., 1992. Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e no verão. Tese (Doutorado em Oceanologia Biológica) Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

CASTILHO, P. C.; MARTINS, I. A.; BIANCHINI, A.; Gill Na⁺/K⁺ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). Journal Experimental Marine Biology and Ecology, v. 256, p. 215-227, 2001.

CHAMBERLIN, M. E.; STRANGE, K. Anisosmotic cell volume regulation: a comparative view. American Journal of Physiology – Cell Physiology, v. 257, p. 159 – 173, 1989.

CHITTÓ, A.L.F., SCHEIN, V., ETGES, R., KUCHARSKI, L.C., DA SILVA, R.S.M. Effects os photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration on organ of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. Invertebrate Biology. v. 128, 261-268, 2009.

CHRISTENSEN, H. N.; CULLEN, A. M. Effects of non-metabolizable analogs on the distribution of amino acids in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 150, 237 – 252, 1968.

DA SILVA R. S. M. ; KUCHARSKI, L. C. R. . Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 101, p. 631-634, 1992.

DRACH, F., TCHERNIGOVITZEFF, C., (1967) Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. *Vie Millieu*, 161:595-607.

ECKHADT, E.; PIERROT, C.; THUET, P.; VAN HERP, F.; DAURES, C. M.; TRILLES, J. P.; CHARMANTIER, G. Stimulation of osmoregulation process in perfused gill of the crab *Poligrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. *General Comparative Physiology*, v. 99, p. 169-177, 1995.

FELIG, P. Amino acid metabolism in man. *Annual Reviews Biochemistry*, v. 44, p. 933-955, 1975.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, H. S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, p. 497-503, 1957.

FREIRE, C. A., ONKEN, H., McNAMARA, J. C. The structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 151, p. 272-304, 2008.

FREIRE, C. A. ; MCNAMARA, J. C. ; ROSA, J. C. ; GREENE, L. J. . Neuroendocrine Control Of Osmotic Regulation In The Freshwater Shrimp *Macrobrachium Olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): Free Amino Acid Concentrations In The Hemolymph.. *General and Comparative Endocrinology*, v. 100, p. 83-91, 1995.

GENOVESE, G., LUCHETTI, C. G., LUQUET, C. M. Na⁺/K⁺ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Marine Biology*, v. 144, p.111-118, 2004.

GILLES, R. "Compensatory" organic osmolytes in high osmolality and dehydration stress: History and perspectives. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 117, p. 279-290, 1987.

GILLES, R., DELPIRE, E. Variations in salinity, osmolarity and water availability: vertebrates and invertebrates. In: Dantzler, W.H.(Ed.), *Handbook of Comparative Physiology*. Vol. II. Oxford University Press, New York, 1523-1586, 1997.

GUIDOTTI, G. G.; GAZZOLA, G. C. Amino acid transporters: systematic approach and principles of control. In: KILBERG, M. S.; HÄUSSINGER, D. (Ed.) Mammalian Amino Acid Transport: Mechanisms and Control. New York: Plenum Press, c. 1, p. 3 – 29, 1992.

HÄUSSINGER, D.; KUBITZ, R.; REINEHR, R.; BODE, J. G.; SCHLIESS, F. Molecular aspects of medicine: from experimental to clinical hepatology. Molecular Aspects of Medicine, v. 25, p. 221-360, 2004.

HOFFMANN, E. K.; LAMBERT, I. H.; PEDERSEN, S. F. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. Physiology Reviews, v. 89, p. 193-277, 2009.

JAHN, M. P.; CAVAGNI, G. M.; KAISER, D.; KUCHARSKI, L. C. Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the Chasmagnathus granulate crab submitted to hyperosmotic stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 334, p. 1-9, 2006.

KINNE, R. K. H. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. Journal of Experimental Zoology, v. 265, p. 346-355, 1993.

KUCHARSKI, L. C. ; DA SILVA, R. S. M. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid in estuarine crab, *Chasmagnathus granulata*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, v. 99, p. 215-218, 1991.

LANG, F.; BUSCH, G. L.; RITTER, M.; VÖLKL, H.; WALDEGGER, S.; GULBINS, E.; HÄUSSINGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiological Reviews, v. 78, p. 247-306, 1998.

LUCU, C.; TOWLE, D. W. Na⁺/K⁺ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 135, p.195-214, 2003.

LUQUET, C. M.; WEIHRAUCH, D.; SENEK, M.; TOWLE, D. W. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in euryaline crab *Chasmagnathus granulata*. *The Journal of Experimental Biology*, v.208, p. 3627-3636, 2005.

LUVIZZOTTO-SANTOS, R.; LEE, J. T.; BRANCO, Z. P.; BIANCHINI, A.; NERY, L. E. M. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *Journal of Experimental Zoology*, v. 295A, p. 200-205, 2003.

MARTINS, T. L. ; CHITTÓ, A. L. F. ; ROSSETTI, C. L. ; BRONDANI, C. K.; KUCHARSKI, L. C. ; DA SILVA, R. S. M. . Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*, v. 158, p. 400-405, 2011.

McNAMARA, J. C.; FARIA, S. C. Evolution of osmoregulatory patterns and gill ion transport mechanisms in the decapods Crustacea: a review. *Journal of Comparative Physiology, Part B*, v. 182, p. 997 – 1014, 2012.

MOON, T. W. Adaptation, constraint and function of gluconeogenesis pathway. Canadian Journal of Zoology, v. 66, p. 1059-1068, 1988.

MORRIS, S. Neuroendocrine regulation of osmoregulation in the evolution of air-breathing in decapods crustaceans. The Journal of Experimental Biology, v. 204, p. 979-989, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. 4^a ed. EUA: Editora W. H. Freeman, 2004.

NERY, L. E. M.; SANTOS, E. A. Carbohydrate metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). Comparative Biochemistry Physiology, Part A, v. 106, p. 747-753, 1993.

NOVO, M. S.; MIRANDA, R. B.; BIANCHINI, A.; Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, v. 323, p. 118-137, 2005.

NURJHAN, N.; BUCCI, A.; PERRIELLO, G.; STUMVOLL, M.; DAILEY, G.; BIER, D. M.; TOFT, I.; JENSSEN T. G.; GERICH, J. E. Glutamine: a major gluconeogenic precursor and vehicle interorgan carbon transport in man. Journal of Clinical Investigation, v. 95, p. 272-277, 1995.

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

OLIVEIRA, G. T.; DA SILVA, R. S. M. Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 188, p. 1429-1435, 1997.

PASANTES-MORALES, H.; LEZAMA, R.A.; RAMOS-MANDUJANO, G.; TUZ, K.L. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *The American Journal of Medicine*, v. 119, p. S4-S11, 2006.

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal Crustacea Biology*, v. 15, p. 1-60, 1995.

PÉQUEUX, A.; VALLOTA, A. C.; GILLES, R. Blood proteins as related to osmoregulation in crustaceans. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, v. 64, p. 433-435, 1979.

ROSAS, C.; CUZON, G.; GAXIOLA, G.; LE PRIOL, Y.; PASCUAL, C.; ROSSIGNYOL, J.; CONTRERAS, F.; SANCHEZ, A.; VAN WORMHOUDT, A. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effects of salinity

and dietary carbohydrate levels. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 259, p. 1-22, 2001.

SAKAI, K.; TÜRKAY, M.; YANG, S. L. Revision of the helice/*Chasmagnathus* complex (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Abh Senckenberg Naturforsch Ges*, v. 565, p. 1-76, 2006.

SCHMIDT-NIELSEN. *Fisiologia animal – adaptação e meio ambiente*. 5ª ed.; Livraria Santos Editora, 2002.

SERRANO, L.; BLANVILLAIN, G.; SOYEZ, D.; CHARMANTIER, G.; GROUSSET, E.; AUJOULAT, F.; SPANINGS-PIERROT, C. Putative involvement of crustacean hyperglycemic hormone isoforms in the neuroendocrine mediation of osmoregulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 979-988, 2003.

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

SCHEIN, V.; WACHÉ, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L. C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R. S. M. Effect of hyperosmotic shock on

phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Letters*, v. 561, p. 202-206, 2004.

SCHEIN, V.; WACHÉ, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L. C.; VAN WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R. S. M. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 316, p. 203-212, 2005a)

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

STOREY, J. M.; STOREY K. B. Functional metabolism: regulation and adaptation. Edited by Kenneth B. Storey. Wiley Liss& Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 2005.

STRANGE, K. Cellular volume homeostasis. *Advances in Physiology Education*, v. 28, p. 155-159, 2004.

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

TURCATO, G. S. Estudo bioecológico do caranguejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na

lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia), UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil, 1990.

VALLE, S. C., EICHLER, P., MACIEL, J. E., MACHADO, G., KUCHARSKI, L. C., Da Silva. R. S. M. Seasonal variation in glucose and neutral amino acid uptake in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 153, p. 252-257, 2009.

VERRI, T.; MANDAL, A.; ZILLI, L.; BOSSA, D.; MANDAL, P. K.; INGROSSO, L.; ZONNO, V.; VILELLA, S.; AHEARN, G. A.; STORELLI, C. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry Physiology, Part A*, v. 130, p. 585-606, 2001.

YAO, D.; MACKENZIE, B.; MING, H.; VAROQUI, H.; ZHU, H.; HEDIGER, M. A.; ERICKSON, J. D. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p. 22790-22797, 2000.

YANCEY, P. H.; CLARK, M. E.; HAND, S. C.; BOWLUS, R. D.; SOMERO, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, v. 217, p. 1214-1222, 1982.