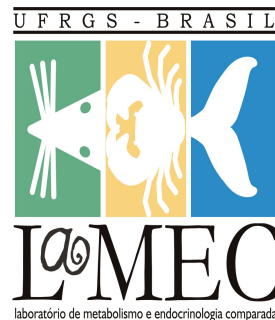




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS: FISILOGIA

Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfisio e-mail: ppgfisio@vortex.ufrgs.br
Rua Sarmento Leite, 500 - 2º andar
90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil
Fone/Fax: (051) 3316-3453



**EFEITO DA ANOXIA E DA RECUPERAÇÃO SOBRE O
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM BRÂNQUIAS DE
Chasmagnathus granulatus ALIMENTADOS COM UMA DIETA RICA
EM PROTEÍNAS OU CARBOIDRATOS**

INAJARA BARRETO KIRST

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Roselis Silveira Martins da Silva

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas – Fisiologia.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

**EFEITO DA ANOXIA E DA RECUPERAÇÃO SOBRE O METABOLISMO DE
CARBOIDRATOS EM BRÂNQUIAS DE *Chasmagnathus granulatus* ALIMENTADOS
COM UMA DIETA RICA EM PROTEÍNAS OU EM CARBOIDRATOS**

Dissertação de Mestrado

INAJARA BARRETO KIRST

Porto Alegre, 2007.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
INTRODUÇÃO	9
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
COLETA DOS ANIMAIS	22
TRATAMENTO DOS ANIMAIS	22
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
PROCEDIMENTOS <i>IN VITRO</i>	24
<i>Oxidação de ¹⁴C-Glicose</i>	24
<i>Síntese e Mobilização de Glicogênio</i>	25
<i>Síntese de Lipídios</i>	26
<i>Captação de Glicose</i>	27
DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	28
<i>Determinação das Proteínas Teciduais</i>	28
<i>Determinação da Glicose Hemolinfática</i>	28
<i>Isolamento e Determinação do Glicogênio</i>	29
TRATAMENTO ESTATÍSTICO	29
RESULTADOS	30
CAPTAÇÃO DE GLICOSE	30
SÍNTESE DE GLICOGÊNIO	32
MOBILIZAÇÃO DE GLICOGÊNIO	34
SÍNTESE DE LIPÍDEOS	38
FORMAÇÃO DE ¹⁴ CO ₂	41
GRUPOS	46
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Dr. Roselis Silveira Martins Da Silva, por ter aceitado me orientar e por ter depositado seu tempo e seus conhecimentos neste trabalho.

À amiga, irmã do coração, colega, Fabiane Ribarcki, com quem dividi não só o trabalho, mas a minha vida.

Agradeço também a colaboração do professor Luiz Carlos Kucharski, por estar sempre disposto a ajudar, ensinar e partilhar seus conhecimentos.

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

Agradeço a minha mãe, pelo apoio incondicional, pelo exemplo de garra, pelo amor e pela valorização em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos da anoxia ambiental e da recuperação da anoxia sobre o metabolismo da glicose em brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas.

Os animais foram coletados e aclimatados em aquários com aeração constante e salinidade de 20‰, temperatura de 25°C e fotoperíodo natural durante 15 dias, onde receberam as respectivas dietas, *ad libitum*, uma vez ao dia no fim de cada tarde. Um grupo foi alimentado com dieta rica em proteínas (HP) e outro com uma dieta rica em carboidratos (HC) pobre em proteínas. As dietas HC e HP são isocalóricas.

Para os estudos de anoxia, grupos de 15 animais que receberam dietas HC ou HP foram mantidos em aquários onde o oxigênio foi substituído por gás N₂, até que a concentração de oxigênio chegasse à zero, e os animais, então, foram submetidos à anoxia durante uma hora, para depois serem utilizados nos experimentos.

O grupo controle foi mantido em normóxia (PO₂ 18,95%), com salinidade 20‰ e temperatura de 25 °C.

Para os experimentos de recuperação, os animais foram mantidos sob as mesmas condições de anoxia descritas acima. Após período de anoxia de 1h, a água desoxigenada foi substituída por água em condições de normóxia. Depois de três horas em normóxia, os animais foram utilizados nos experimentos.

Após os períodos de anoxia ou de recuperação eram coletadas amostras de hemolinfa e os animais eram crioanestesiados durante cinco minutos para a retirada das brânquias

anteriores e posteriores utilizadas nos experimentos. Animais do grupo em normóxia (controle) sofriam os mesmos tratamentos.

Nas brânquias anteriores de animais que receberam dieta HP e foram submetidos à recuperação, verifica-se uma diminuição de 33% na captação de glicose ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo anoxia.

Nas brânquias posteriores de animais que receberam a dieta HC e foram submetidos à recuperação, a capacidade de síntese de glicogênio aumentou 60% ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Nas brânquias posteriores de animais com dieta HC, pós-incubação de 1 h em meio livre de glicose, a concentração de ^{14}C -glicogênio foi 8 e 4 vezes maior ($p < 0,05$) no grupo recuperação quando comparada àquelas obtidas nos grupos controle e anoxia, respectivamente. Nas brânquias anteriores (dieta HC), no grupo recuperação, a concentração de ^{14}C -glicogênio foi cerca de 2,5 vezes maior ($p < 0,05$) quando comparada àquela obtida no grupo controle.

Nas brânquias posteriores de animais que receberam a dieta HP, grupo anoxia, a síntese de lipídeos ($p < 0,05$) aumentou cerca de 6 vezes quando comparada àquela do controle. Na fase de recuperação, a síntese de ^{14}C -lipídios reduziu 3 vezes quando comparada àquela observada no grupo anoxia. A comparação entre as duas dietas demonstra que a síntese de ^{14}C -lipídios no grupo anoxia da dieta HP foi 2 vezes maior ($p < 0,05$) que aquela constatada no mesmo grupo em caranguejos alimentados com a dieta HC. Nas brânquias anteriores de animais que receberam a dieta HP, grupo anoxia, a síntese de lipídios aumentou cerca de 3 vezes ($p < 0,05$) quando comparada àquela do controle. Na fase de recuperação, a síntese de ^{14}C -lipídios reduziu 6 vezes quando comparada àquela observada no grupo anoxia. A comparação entre as duas dietas mostra que a síntese de ^{14}C -lipídios no grupo anoxia da dieta

HP foi 3 vezes maior ($p < 0,05$) que aquela constatada no mesmo grupo em caranguejos alimentados com a dieta HC.

Nas brânquias posteriores e anteriores dos animais em normóxia (controle) alimentados com dieta rica em proteínas, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ foi 5 e 10 vezes maior ($p < 0,05$), respectivamente, comparada ao grupo HC. Nas brânquias posteriores, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no grupo HP submetido à recuperação diminuiu 39% ($p < 0,05$) em relação ao grupo submetido à anoxia. Nas brânquias anteriores, no grupo HP em recuperação, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ foi 59% e 60% menor, quando comparada às obtidas nos grupos anoxia e controle, respectivamente.

Nas brânquias posteriores de animais alimentados com dieta HP a anoxia por 1h reduziu ($p < 0,05$) a concentração de glicogênio. O período de 3h em normóxia não foi suficiente para que os níveis de glicogênio voltassem a valores semelhantes aqueles do grupo controle. Nas brânquias posteriores de caranguejos mantidos com a dieta HC, a recuperação de 3h aumentou 2 e 4 vezes ($p < 0,05$) a concentração de glicogênio quando comparada às obtidas nos grupos controle e anoxia, respectivamente. Nas brânquias anteriores do grupo HC, a recuperação de 3h incrementou significativamente os valores de glicogênio, quando comparados às obtidos no grupo anoxia.

Em animais do grupo HC submetidos à anoxia aumentaram significativamente ($p < 0,05$) os valores de glicose hemolinfática. Entretanto, a recuperação por 3h diminuiu em apenas 50% ($p < 0,05$). No grupo HP a anoxia também elevou significativamente os valores de glicose na hemolinfa. Contudo, a recuperação de 3h foi suficiente para que a concentração de glicose hemolinfática chegasse a valores semelhantes às verificadas no grupo controle. A comparação dos valores de glicose hemolinfática entre os grupos HP e HC mostra, nas 3

situações experimentais estudadas, concentrações significativamente maiores no grupo alimentados com a dieta HC.

Os resultados do presente trabalho mostram que em *C. granulatus* a glicose foi utilizada nas brânquias por diferentes vias durante o estresse anóxico e a fase de recuperação. Entretanto, a composição da dieta administrada por 15 dias aos caranguejos modifica o fluxo deste substrato para vias diferenciadas, alterando, assim, o padrão de resposta metabólica ao estresse anóxico e à fase de recuperação.

INTRODUÇÃO

A partir do ambiente marinho ancestral, diferentes grupos de animais invadiram a água doce, enquanto outros migraram para a terra. A adaptação evolutiva à respiração aérea ocorreu apenas entre os artrópodes e os vertebrados (Barnes, 1990; Schmidt-Nielsen, 2002; Dias, 2000).

O *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851), um caranguejo da família Varunidae (Decapoda, Crustacea), é uma espécie típica de estuário que evoluiu a partir de formas marinhas. Ele habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o golfo de São Martin, na Argentina (Boschi, 1964).

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre o ambiente marinho e límnic, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros de completa exposição do substrato. Esses ecossistemas sofrem influências 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). Mudanças comportamentais, estruturais, funcionais e bioquímicas ocorrem nos organismos lagunares e estuarinos, capacitando-os a tolerar as freqüentes alterações das características físico-químicas do meio ambiente (Gilles, 1997).

Algumas espécies de caranguejos, como o *C. granulatus*, mantêm as brânquias constantemente umedecidas ao sair do ambiente aquático por meio de um sistema de circulação localizado entre as bases dos pereiópodos, que capta a água da superfície externa do corpo e a libera na cavidade branquial, promovendo a renovação dos teores de oxigênio (Hartnoll, 1988; Bond-Buckup e cols., 1991; Luquet e cols., 2000).

Está bem documentado na literatura que, em áreas estuarinas e intertidais, as flutuações constantes de salinidade impõem um estresse iônico à sua biota. Essas variações de salinidade induzem mudanças na composição orgânica e inorgânica dos fluidos corporais dos organismos de estuários e marinhos intertidais, exigindo desses animais ajustes homeostáticos compensatórios (Kasschau e cols., 1984 a, b; Matsushima e Hayashi, 1992; Bishop e Burton, 1993; Okuma e Abe, 1994). A aquisição da capacidade osmorreguladora desempenhou um importante papel na conquista de novos habitats por esses animais (Péqueux, 1995).

Podem-se distinguir duas formas de ajuste osmótico nos organismos aquáticos em resposta às variações de salinidade do meio: osmoconformação e osmorregulação. Nas espécies osmoconformadoras, a pressão osmótica intracelular pode variar de acordo com a alteração de osmolalidade do meio, ou seja, esses animais mantêm a osmolalidade dos seus fluidos corporais semelhante àquela do meio em que se encontram. As espécies osmorreguladoras são capazes de tolerar alterações de salinidade do meio com variação mínima na osmolaridade da hemolinfa (Péqueux, 1995, Schmidt-Nielsen, 2002).

Entre os crustáceos decápodos, encontram-se desde animais marinhos estenoalinos com pouca ou nenhuma capacidade osmorreguladora, portanto, tolerantes a pequenas variações de salinidade, até animais estuarinos eurialinos tolerantes às grandes variações de salinidade do meio com variação mínima na osmolaridade hemolinfática (Huggins e Munday, 1968; Mantel e Farmer, 1983; Péqueux, 1995, Schmidt-Nielsen, 2002).

O caranguejo *C. granulatus* pode ser classificado como eurialino, uma vez que suporta uma ampla variação de salinidade e como um regulador hiper-hiposmótico, apresentando hemolinfa hiposmótica em meio concentrado (40‰) e hemolinfa hiperosmótica em meio diluído (0‰ a 20‰) (Mañe-Gazon e cols., 1974). Seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e no verão, respectivamente (Bromberg, 1992).

Esse caranguejo, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos e cols., 1987), é capaz de suportar longos períodos fora da água e de exposição ao sol, sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon e cols., 1974). Quando exposto ao ar atmosférico, diminui o consumo de oxigênio e reduz a motilidade (Santos e cols., 1987).

Em seu habitat, o caranguejo *C. granulatus* distribui-se por áreas com ou sem vegetação onde abre galerias ou tocas com dimensões variáveis, conforme os níveis da maré e do lençol freático. Esse procedimento garante água no fundo da toca e minimiza as amplitudes de variações de salinidade e de temperatura, mas não àquelas de teor de O₂ dissolvido na água (Botto e Irigoyen, 1980).

Na lagoa de Tramandaí (RS, Brasil), em pântanos salgados ocupados por populações de *C. granulatus*, Turcato (1990) verificou que o teor de oxigênio dissolvido na água varia de 2,78 mgO₂/l até 11,78 mgO₂/l e a salinidade de 0,22‰ até 34‰. Porém, durante os meses de inverno, os níveis de O₂ dissolvido nas habitações subterrâneas atingem valores muito próximos de zero.

Os animais maiores, principalmente os machos, são facilmente encontrados em locais abertos, enquanto as fêmeas e os animais jovens buscam refúgio junto à vegetação ribeirinha formada, em grande parte, por juncos (Bond-Buckup e cols., 1991). Segundo Turcato (1990), nos meses de primavera e de verão, esses caranguejos são encontrados na zona infralitoral em busca de alimento. Já nos meses de outono e inverno, permanecem no interior das tocas por um período maior e apresentam uma redução na atividade metabólica (D’Incao e Ruffino, 1990). É importante observar que no período de inverno, além da baixa temperatura do ambiente (média de 15°C), o *C. granulatus* depara-se com uma baixa oferta de itens

alimentares e conseqüentemente, menores disponibilidade de substrato energético (D’Incao e cols., 1990).

Segundo D’Incao e cols. (1990) o *C. granulatus* é uma espécie oportunista, a análise do conteúdo estomacal desses caranguejos mostra, no outono e inverno, restos de vegetais; na primavera maior freqüência de itens de origem animal; no verão, equilíbrio entre os dois itens alimentares. Eventualmente, o *C. granulatus* comporta-se como carnívoro, atacando sua própria comunidade (canibalismo), peixes e outros crustáceos, sendo classificado como omnívoro-detritívoro (Botto e Irigoyen, 1980).

O caranguejo *C. granulatus* é um excelente modelo biológico para investigação do metabolismo intermediário em invertebrados, visto que este animal apresenta uma fácil adaptação às condições de laboratório.

Variações no teor de O₂ na água estimulam mecanismos fisiológicos compensatórios como: alterações significativas na ventilação, na circulação, no metabolismo e nas propriedades de afinidade da hemocianina ao O₂ (Oliveira, 1998). A hemocianina é um pigmento respiratório que apresenta elevado peso molecular. O metal diretamente ligado à proteína é o cobre e apresenta propriedades semelhantes às da hemoglobina, captando oxigênio quando a pressão parcial é alta e liberando-o quando a pressão é baixa. A ligação do oxigênio com a hemocianina ocorre na proporção de 1ml de O₂/g de pigmento respiratório, quando oxigenada apresenta coloração azulada e quando desoxigenada é incolor (Hill, 1980; Withers, 1992).

Em crustáceos foram identificadas três diferentes estratégias adaptativas que permitem a sobrevivência em hipóxia ou anoxia ambiental: 1) manutenção em todos os tecidos de altas concentrações de glicogênio e de fosfato (ex. arginina fosfato) em condições aeróbicas; 2) utilização de vias anaeróbicas para a produção de ATP; 3) redução do gasto energético

(Hervant e cols., 1995; Childress e Seibel, 1998); 4) depressão metabólica. Além disso, a duração e a eficiência do processo de recuperação são importantes para a rápida reposição das reservas energéticas e a remoção dos produtos finais acumulados durante a anoxia e a hipóxia (Hervant e cols., 1999).

Nos crustáceos *Niphargus rhenorhodanensis* e *Gammarus fossarum* 1 h de hipóxia ambiental diminui significativa da atividade locomotora. Durante o período de recuperação da hipóxia, os animais aumentaram significativamente a atividade locomotora quando comparados ao grupo hipóxia, contudo, a atividade foi menor quando comparada àquela do grupo controle em normóxia (Hervant e cols., 1995). Os mesmos autores também constataram que ocorria 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 (TL₅₀) 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 (TL₅₀) de 19h:45min. em animais submetidos por 30 horas à anoxia ambiental.

Nos crustáceos, a glicose tem cinco destinos principais: a síntese de quitina, a síntese de mucopolissacarídeo, a síntese de ribose e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

reduzido, a síntese de glicogênio e a formação de piruvato (Chang e O'Connor, 1983; Hochachka e cols., 1970; Herreid e Full, 1988).

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). A ausência de um depósito central de glicogênio seria uma adaptação importante para animais que em seus habitats estariam submetidos a períodos de hipóxia ambiental e que possuem o sistema circulatório do tipo aberto, com baixa pressão e fluxo lento, determinando uma distribuição menos efetiva de glicose para os tecidos (Hochachka e Somero, 1984).

A via de Embden-Meyerhof ou via glicolítica é uma via utilizada pelas células para extrair parte da energia química inerente à molécula de glicose. A glicólise ocorre em todos os organismos, as enzimas que fazem parte desta via metabólica estão entre as mais conservadas, sendo encontradas das bactérias aos mamíferos (Webster, 2003).

Em anaerobiose, a via glicolítica converte o piruvato a lactato por ação da lactato desidrogenase, gerando 2 moles de ATP por mol de glicose. Em aerobiose a via glicolítica converte a glicose a piruvato e por ação da piruvato desidrogenase à Acetil-CoA que será, então, oxidada no ciclo de Krebs a CO_2 e H_2O , gerando 36-38 moles de ATP por mol de glicose (Marks e cols.,1996).

Há numerosos moduladores do fluxo glicolítico. Pasteur (1861) demonstrou, em levedura de cerveja, que o oxigênio inibe a fermentação e que o consumo de glicose é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio. Portanto, a via glicolítica é positivamente regulada pela redução no teor de oxigênio do meio. Este efeito foi evidenciado em diferentes células e tecidos de invertebrados e de vertebrados (Hochachka e Lutz, 2001). Em reconhecimento a Louis Pasteur, este fenômeno é conhecido mundialmente como “Efeito Pasteur” (Hochachka e Lutz, 2001).

Estudos sobre o metabolismo de carboidratos em crustáceos têm demonstrado a presença das vias da glicogênese, da glicogenólise, da gliconeogênese e da glicólise em diferentes tecidos (Chang e O’Connor, 1983; Loret e cols., 1989; Loret e Devos, 1992; Da Silva e Kucharski, 1992; Schmitt e Santos, 1993; Oliveira e Da Silva, 1997; Oliveira e cols., 2001; Schein e cols., 2004).

Oliveira (1998) observou que a primeira hora de anoxia ambiental, em *C. granulatus* alimentados com dieta rica em carboidratos, provocou um aumento na concentração de glicose na hemolinfa, sugerindo que a mobilização de glicose dos tecidos (muscular e branquial) excedeu a sua utilização na via glicolítica determinando o acúmulo de glicose na hemolinfa. Outros trabalhos realizados em crustáceos também verificaram que a exposição dos caranguejos a hipóxia ou a anoxia ambiental provoca hiperglicemia (Van Aardt, 1988; Gonçalves, 1993).

Trabalhos realizados em nosso laboratório 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 ou proteínas 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).

Os valores de glicose na hemolinfa 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 a dieta HC ou HP (Oliveira e cols., 2001). 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 àqueles dos animais em normóxia e em anoxia. Já a mobilização do ^{14}C -glicogênio no hepatopâncreas está aumentada durante a anoxia e reduzida na fase de recuperação (Oliveira e cols., 2001).

Recentemente, Marqueze e cols. (2006) constataram, em *C. granulatus* alimentado com a dieta rica em proteínas, que 1h de anoxia estimulou a atividade da via glicolítica no músculo e que a manutenção dos animais por 3h em normóxia (recuperação) não reduziu os valores da atividade da enzima piruvato quinase. Tanto em *C. granulatus* alimentados com a dieta rica em carboidratos como naqueles mantidos com a dieta rica em proteínas, a anoxia de 1h reduziu marcadamente a concentração de glicogênio muscular e o período de 3h de recuperação não foi suficiente para o retorno aos valores do grupo normóxia (Marqueze e cols, 2006).

Os principais lipídios de crustáceos são os lipídios 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 lipídios durante a embriogênese e o período reprodutivo (Sibert e cols., 2004; Rosa e cols., 2005; Calado e cols., 2005; Rosa e Nunes, 2003).

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).

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 *Euphausia crystallorophias* os níveis de lipídios são mais baixos no inverno do que no verão (Nicol e cols., 2004). Camarões *Neomarica gracilis* que vivem há 1000 metros de profundidade onde a concentração de oxigênio é mínima, possuem triglicerídios como sua maior reserva lipídica (Allen e cols., 2000). O caranguejo decápode *Paralomis granulosa* apresenta um padrão diferenciado de adaptação ao jejum. Inicialmente utiliza as proteínas como reserva energética e após os lipídios totais (Comoglio e cols., 2005). O efeito do jejum longo e da realimentação foi verificado 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.

Em *C. granulatus* alimentado com dieta rica em proteínas, Vinagre e Da Silva (2002) 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 a dieta rica em carboidratos (Vinagre e Da Silva, 1992).

Em *C. granulatus* o jejum de 3 semanas não alterou a síntese de lipídios 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 lipídios no músculo ocorre no verão e diminui no outono e no inverno. Já as reservas de lipídios no hepatopâncreas são significativamente elevadas, cerca de 20% do peso do órgão, diminuindo somente no outono. Kucharski e Da Silva (1991a) sugerem que o glicogênio estocado no hepatopâncreas e no músculo seria consumido como substrato energético durante os meses de primavera e de verão. Já no outono e no inverno, a reserva de lipídio muscular seria o principal substrato energético.

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 lipídios totais no hepatopâncreas quando comparada com aquela verificada nos animais do campo ou naqueles alimentados com uma dieta rica em carboidratos.

Está descrito na literatura que o tecido branquial de crustáceos apresenta uma diferenciação funcional e estrutural. As brânquias anteriores apresentam um epitélio do tipo respiratório e não sofrem alterações significativas na sua estrutura quando ocorrem variações de salinidade no meio. Já nas brânquias posteriores, a atividade osmorreguladora é predominante e, dependendo da salinidade do meio no qual se encontra o animal, o processo de transporte de cloreto de sódio pode ser ativado ou inibido. Também nessas brânquias ocorrem modificações na ultraestrutura do epitélio de transporte, com um aumento nas vilosidades da membrana apical e no número de mitocôndrias, indicando elevação do metabolismo oxidativo e da produção de dióxido de carbono (Wellcomme e Devos, 1991; Chausson e Regnault, 1995; Péqueux e Gilles, 1984).

Diferenças morfológicas e ultra-estruturais já foram descritas em brânquias de *C. granulatus*. Durante a aclimação ao estresse (hiper ou hiposmótico) o epitélio das brânquias anteriores não apresentou variações na espessura, sugerindo uma função respiratória. Em contraste, a espessura epitelial das brânquias posteriores aumentou significativamente em ambos os estresses. As brânquias posteriores estão envolvidas tanto com a captação quanto com a secreção de íons dependendo do meio em que os caranguejos são aclimatados (Genovese e cols., 2000; Luquet e cols., 2002).

Castilho e cols. (2001) descreveram que a atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e a sua afinidade por sódio foram maiores nas brânquias posteriores do que nas brânquias anteriores, sugerindo a presença de diferentes isoformas dessa enzima nas brânquias anteriores e posteriores em *C. granulatus*. A atividade dessa enzima está diminuída tanto nas brânquias anteriores quanto nas posteriores de caranguejos durante o estresse hiperosmótico. Já o estresse hiposmótico aumentou a atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ somente nas brânquias posteriores (Castilho e cols., 2001).

Os três pares branquiais do caranguejo *C. granulatus* estão em contato direto com o meio externo e precisam dispor de mecanismos regulatórios osmóticos que possibilitem ajustes rápidos às variações de salinidade impostas pelo ambiente estuarino. Já foi demonstrado em *Macrobrachium olfersii* que fatores neuroendócrinos influenciam os processos de osmorregulação em crustáceos (Freire e cols., 1995).

Em 2002, Kucharski e cols. verificaram que a insulina bovina aumentou a incorporação do ^{14}C -glicose e a captação de glicose em brânquias posteriores de *C. granulatus*, contudo o efeito não foi observado em brânquias anteriores. A magnitude da estimulação foi influenciada pela variação sazonal, sendo que no verão a dose necessária para promover esse aumento foi de $40\mu\text{U/ml}$ e no inverno foi de $20\mu\text{U/ml}$.

Martins (2003) demonstrou que o tratamento do caranguejo *C. granulatus* com insulina porcina por 8 dias aumentou a captação de aminoácidos (ácido amino butírico – AIB) nas brânquias posteriores e no hepatopâncreas e a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase nas brânquias posteriores.

Trapp (2005) demonstrou em *C. granulatus* que o estresse osmótico altera as características do *receptor insulin-IGF-I like* em brânquias anteriores e posteriores.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos da anoxia ambiental e da recuperação da anoxia sobre o metabolismo da glicose em brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP).

Para isto, foram objetivos específicos:

-Determinar as variações dos níveis de glicose hemolinfática e de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos alimentados com as dietas HC ou HP e submetidos à anoxia e a fase de recuperação da anoxia.

-Avaliar, *in vitro*, os efeitos da anoxia e da recuperação da anoxia sobre a captação de glicose, a síntese e mobilização de glicogênio, a síntese de lipídios e a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose, em caranguejos alimentados com dieta HC ou HP.

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 e Tchernigovtzeff (1967).

Os animais foram trazidos ao laboratório, onde permanecem durante 24 horas em água destilada para retirada de parasitas e esvaziamento do conteúdo estomacal.

Tratamento dos Animais

Após este período, os animais foram separados em dois grupos: A) animais que receberam uma dieta rica em carboidratos (arroz cozido, HC) (Tabela 1); B) animais que receberam uma dieta rica em proteínas (carne bovina, HP) (Tabela 1).

A dieta HC possui aproximadamente o mesmo valor calórico da dieta HP, sendo então consideradas dietas isocalóricas. A análise do conteúdo das respectivas dietas foi determinada pelo Instituto de Tecnologia e Alimento da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (Tabela 1).

Os animais foram aclimatados em aquários com aeração constante e salinidade de 20‰, temperatura de 25⁰C e fotoperíodo natural durante 15 dias, onde receberam as respectivas dietas uma vez ao dia, no fim de cada tarde, *ad libitum*.

Tabela 1. Composição das dietas administradas *ad libitum* ao *Chasmagnathus granulatus*. Os valores relativos a cada item estão expressos em percentuais e os valores calóricos total estão expressos em cal/100g.

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

Procedimento Experimental

Para os estudos de anoxia, grupos de 15 animais alimentados com dieta HC ou HP foram mantidos em aquários de vidro (30x25x30 cm), com salinidade de 20‰ e temperatura de 25 °C. O oxigênio nestes aquários foi substituído por gás N₂ durante 40 minutos, até que a concentração de oxigênio chegasse à zero (monitorada com Oxímetro Oxel-1/ISO₂, 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 nos aquários em normóxia (PO_2 18,95%), com salinidade 20‰ e temperatura de 25 °C.

Para os experimentos de recuperação, os animais foram mantidos sob as mesmas condições de anoxia descritas acima. Após o período de anoxia de 1h, a água desoxigenada

foi substituída por água em condições de normóxia. Depois de três horas de recuperação em normóxia, os animais foram utilizados nos experimentos.

Após o período de anoxia ou de recuperação eram coletadas amostras de hemolinfa e os animais eram crioanestesiados durante cinco minutos para a retirada das brânquias anteriores e posteriores utilizadas nos experimentos. Animais do grupo em normóxia (controle) sofriam o mesmo tratamento.

Procedimentos *in vitro*

Oxidação de ^{14}C -Glicose

As brânquias anteriores e posteriores foram rapidamente removidas e acondicionadas em placas de Petri contendo meio de incubação específico para *C. granulatus* [Solução Fisiológica de Caranguejo (SFC)]: 350mM NaCl, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 8,8mM H₃BO₃, 25mM CaCl₂, 10mM HEPES e 0,1mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), pH 7,8.

As amostras de tecido (cerca de 50 mg) foram então colocadas em frascos de vidro com tampa de borracha, contendo 1ml de SFC acrescida de 0,2 μCi [U- ^{14}C]-glicose (230 mCi mmol⁻¹, Amersham International) e 10mM glicose, aerados por 30 segundos com uma mistura de O₂:CO₂ (95:5 v/v) e selados com parafilme para impedir o escape do CO₂ formado. Presos às tampas de borracha estavam bastões em forma de J com um poço de vidro, que continham papel Watmann 3MM. As amostras foram incubadas sob agitação constante a 25°C durante 60 minutos.

A incubação foi interrompida com a adição de 0,2 ml de TCA 50%, injetados através da tampa de borracha do frasco com a ajuda de uma seringa. Então, 0,2 ml de hidróxido de sódio 2M foram injetados nos poços dos bastões de vidro para capturar o $^{14}\text{CO}_2$. Os frascos lacrados com parafilme permaneciam no laboratório durante 12 h, a temperatura ambiente,

para a total captação de $^{14}\text{CO}_2$ (Torres e cols., 2001). Depois desta etapa, os bastões de vidro com o pocinho eram transferidos para viais contendo líquido de cintilação (tolueno-triton100X (2:1)-PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade determinada em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os valores da oxidação de ^{14}C -glicose foram expressos em μmol de glicose ^{14}C incorporada em $^{14}\text{CO}_2$ por g tecido^{-1} por t^{-1} incubação.

Síntese e Mobilização de Glicogênio

Para os experimentos de síntese e de mobilização de glicogênio, as brânquias anteriores e posteriores foram rapidamente removidas e acondicionadas em placas de Petri contendo SFC gelada (pH 7,8).

As amostras de tecido (cerca de 50 mg) foram então colocadas em tubos de plástico de 2 ml com tampa, contendo 0,5ml SFC (pH 7,8), acrescida de 0,2 μCi [$\text{U-}^{14}\text{C}$]-glicose (230 mCi mmol^{-1} , Amersham International) e 10mM glicose, aeradas por 30 segundos com uma mistura de $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5 v/v) e incubadas por 2 horas em banho a 25°C com agitação constante. Após a incubação, uma parte das amostras era processada para a síntese de ^{14}C -glicogênio e outra parte era utilizada para o estudo de mobilização do glicogênio pré-marcado. Para a mobilização, os tecidos com ^{14}C -glicogênio (pré-marcados) eram lavados por três vezes em SFC gelada, secos em papel filtro e colocados em frascos contendo SFC (pH 7,8) sem glicose (não marcada ou marcada), sendo aerados por 30 segundos com uma mistura de $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5 v/v) e incubados em banho metabólico sob as mesmas condições acima descritas acima.

Para a determinação do ^{14}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 SFC gelado, secos em papel filtro, colocados em 200 μl de

KOH (0,5N) e levados ao banho de 80°C por 1 hora. Depois desta etapa, foram retiradas amostras (50µL) para a determinação de proteínas totais. Às amostras de tecidos hidrolisados foi acrescentado TCA 30% e HCL 1N, respectivamente, para a desproteíntização e a neutralização em uma proporção de 2:1. Então, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 rpm. Os sobrenadantes (30µL) foram pipetados em papel Wattmann 3MM. Para a precipitação do ¹⁴C-glicogênio no papel, 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 a temperatura ambiente (Thomas e cols., 1968). 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 5ml de líquido de cintilação (tolueno-triton100X (2:1)-PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade era medida em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos em µg de glicose-U-¹⁴C incorporada em glicogênio por g⁻¹ de proteína por t⁻¹ de incubação.

Síntese de Lipídios

Para os experimentos de síntese de lipídios, as brânquias anteriores e posteriores foram rapidamente removidas e acondicionadas em placas de Petri contendo SFC gelada (pH 7,8).

As amostras de tecido foram então colocadas em tubos de plástico com tampa de 2ml (previamente pesados), contendo 250µl de SFC (pH 7,8), acrescido de 0,2 µCi [U-¹⁴C]-glicose (230 mCi mmol⁻¹, Amersham International) e 15mM glicose que foram novamente pesados. Após foi realizada a substituição, por 30 segundos, da fase gasosa por uma mistura de O₂:CO₂ (95:5 v/v) e as amostras incubadas por 2 horas em banho a 25°C com agitação constante.

Após a incubação, as reações bioquímicas foram paradas em banho de gelo. Os tecidos foram lavados em SFC gelada, secos em papel filtro e homogeneizados em clorofórmio:metanol na proporção de 2:1 (v/v). As amostras foram filtradas e colocadas em solução salina (0,9%), na proporção de 5:1 (v/v), e centrifugadas por 5 minutos a 1500rpm. A fase superior foi descartada e amostras de 2ml foram retiradas e colocadas em viais e deixadas em uma capela para a evaporação total do clorofórmio. Após, aos viais foram adicionados 5ml 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 com 97% de eficiência.

Os resultados foram expressos em μmol de ^{14}C -glicose incorporada em lipídios totais por g^{-1} tecido por h^{-1} .

Captação de Glicose

Para os experimentos de captação de glicose, as brânquias anteriores e posteriores foram rapidamente removidas e acondicionadas em placas de Petri contendo SFC gelada (pH 7,8).

As amostras de tecido foram colocadas em tubos plásticos de 2ml com tampas, previamente pesados, contendo 0,5ml de SFC (pH 7,8), acrescidos de 0,2 μCi 2-Deoxi-D-glicose-1- ^{14}C (230 mCi mmol^{-1} , Amersham International) e foram novamente pesados. Após, era feita a substituição da fase gasosa por uma mistura de $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5 v/v) durante 30 segundos, em seguida os frascos eram fechados e incubados em banho metabólico a 25°C sob agitação constante por um período de 60 minutos.

Após a incubação, a reação era interrompida com gelo, os tecidos retirados do meio e lavados com SFC gelada, secos em papel filtro e colocados em frascos de vidro com tampa

contendo 1ml de água bi-destilada. Os frascos com os tecidos foram congelados e fervidos (a 100°C) por três vezes consecutivas para que ocorresse a ruptura das células e a liberação da 2-Deoxi-D-glicose-1-¹⁴C captada pelo tecido (meio interno). Os tubos que continham o meio de incubação (meio externo) foram congelados até o processamento das amostras. Amostras de 100ul do meio interno e externo foram colocadas, separadamente, em viais contendo líquido de cintilação (tolueno-triton100X (2:1)-PPO 0,4%, POPOP 0,01%), acrescidas com 100ul de água bi-destilada para corrigir a turvação. A radioatividade foi quantificada em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos pela relação de radioatividade contida no tecido (meio interno) e o meio de incubação (meio externo) (T/M: dpm/ml meio interno dividindo dpm/ml do meio de incubação).

Determinações Bioquímicas

Determinação das Proteínas Teciduais

A concentração de proteínas totais nos tecidos foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão.

Determinação da Glicose Hemolinfática

A concentração de glicose hemolinfática foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase, com o kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). A leitura das amostras foi realizada em um aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) em comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em mmol/L.

Isolamento e Determinação do Glicogênio

Nas brânquias anteriores e posteriores, o isolamento de glicogênio seguiu o método de Van Handel (1965), sendo determinado como glicose após hidrólise ácida como descrito por Geary e cols. (1981). A dosagem de glicose foi pelo método enzimático da glicose-oxidase, com o kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda). A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos foi expressa em mg.g^{-1} de tecido úmido.

Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos em médias \pm desvio padrão (DP). 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 2-Deoxi-D-glicose-1-¹⁴C nas brânquias posteriores de *C. granulatus* previamente alimentados com dietas HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e 3h de recuperação podem ser vistos na figura 1. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle, anoxia e recuperação, assim como entre as dietas.

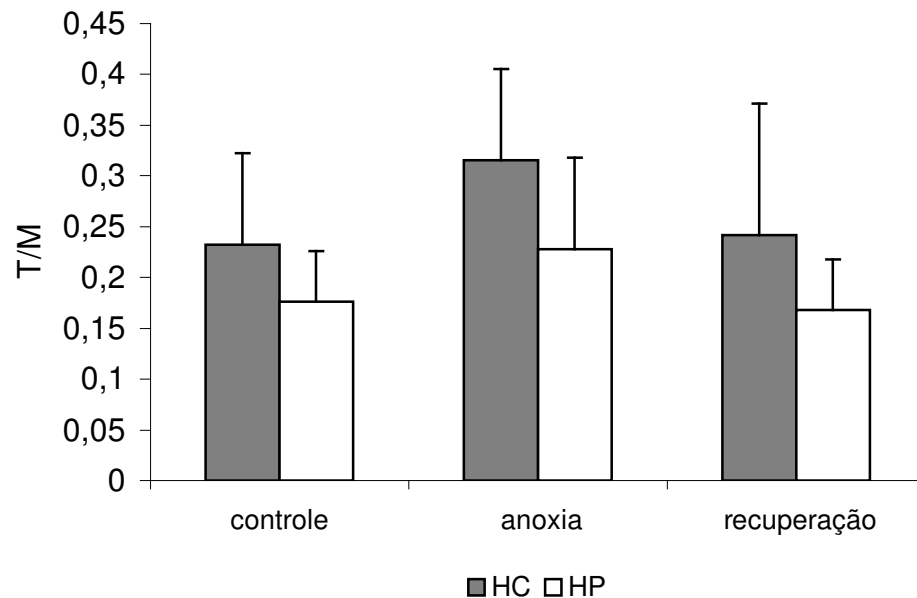


Figura 1: Captação de 2-Deoxi-D-glicose-1-¹⁴C nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à anoxia e à recuperação. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias.

Os valores de captação de 2-Deoxi-D-glicose-1-¹⁴C nas brânquias anteriores de *C. granulatus* previamente alimentados com dietas HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h

de recuperação podem ser vistos na figura 2. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle, anoxia e recuperação na dieta HC. Também na dieta HP não foram encontradas variações significativas entre os grupos controle e anoxia, contudo, na recuperação, verifica-se uma diminuição de 33,3% ($p < 0,05$) da captação de glicose, quando comparada ao grupo anoxia. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos HC e HP.

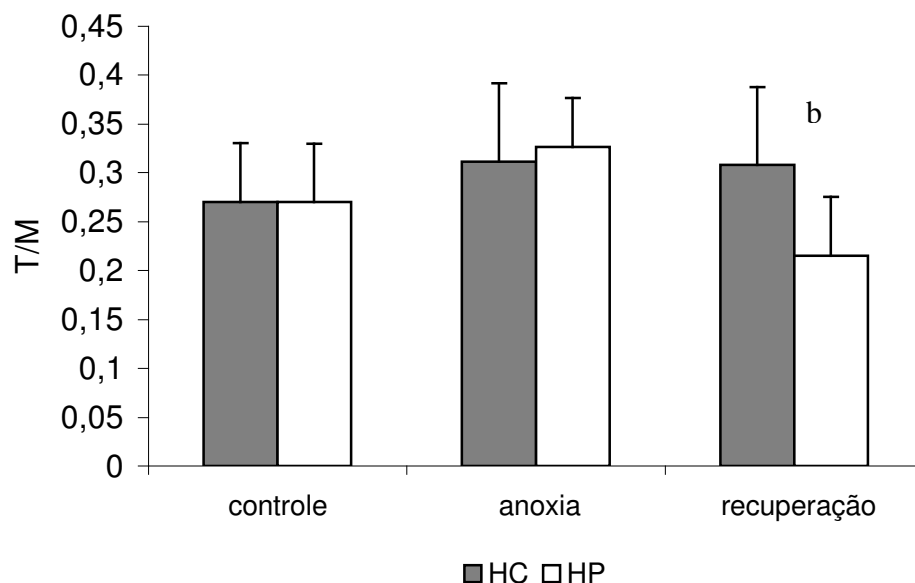


Figura 2: Captação de 2-Deoxi-D-glicose-1-¹⁴C nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à anoxia e à recuperação. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. “b” representa a diferença significativa em relação à anoxia ($p < 0,05$).

Síntese de Glicogênio

Os resultados da incorporação da glicose-U-¹⁴C em glicogênio nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 3. No grupo HC não foram verificadas alterações significativas entre os grupos controle e anoxia. Já nos animais que receberam a dieta HC e foram submetidos à recuperação, a capacidade de síntese aumentou 60% ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Não foram observadas diferenças significativas entre os 3 grupos experimentais nos animais alimentados com a dieta HP. Também não foram verificadas diferenças significativas de síntese de glicogênio entre os caranguejos alimentados com a dieta HC e aqueles mantidos com a dieta HP nas situações experimentais estudadas.

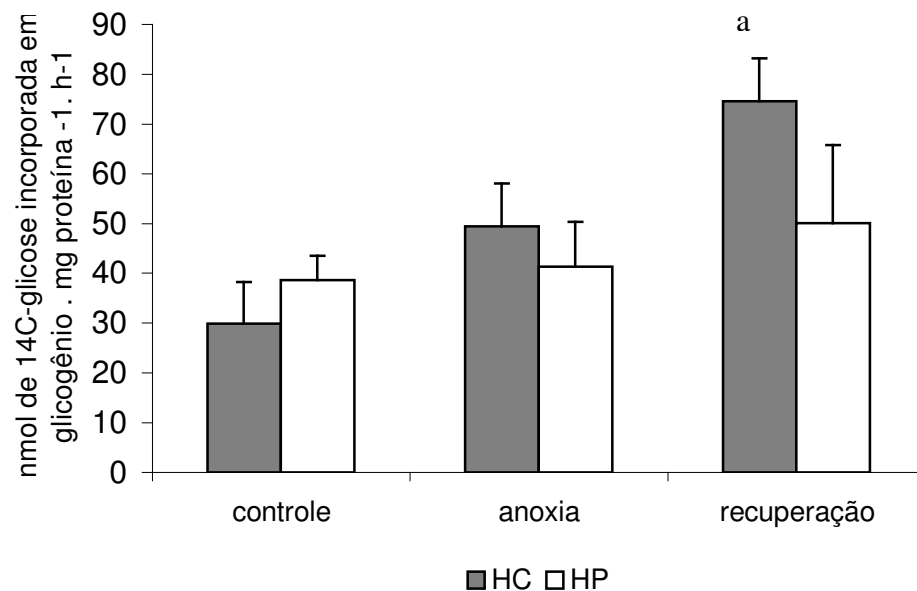


Figura 3: Síntese de ¹⁴C-glicogênio a partir de D-glicose-U-¹⁴C em brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. “a” representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Os resultados da incorporação da glicose-U-¹⁴C em glicogênio nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 4. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos controle, anoxia e recuperação tanto nos caranguejos alimentados com a dieta HP como naqueles mantidos com a dieta HC. Também não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos HC e HP nas situações experimentais estudadas.

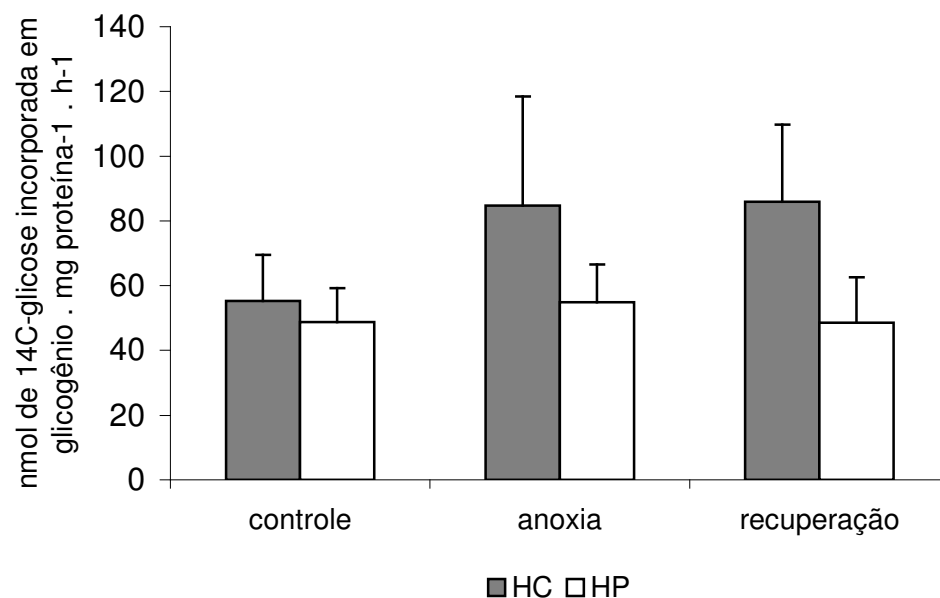


Figura 4: Síntese de ¹⁴C-glicogênio a partir de D-glicose-U-¹⁴C em brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões. O número de animais em cada ponto foi de 3-9.

Mobilização de Glicogênio

Os resultados de mobilização do ¹⁴C-glicogênio em brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 5. Não foram verificadas diferenças significativas da concentração de ¹⁴C-glicogênio entre os grupos controle e anoxia após o período de incubação em meio livre de glicose. Entretanto, na pós-incubação de 1 h em meio livre de glicose, a concentração de ¹⁴C-glicogênio foi 8 e 4 vezes maior ($p < 0,05$) maior no

grupo recuperação quando comparada àquelas obtidas nos grupos controle e anoxia, respectivamente. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas dietas.

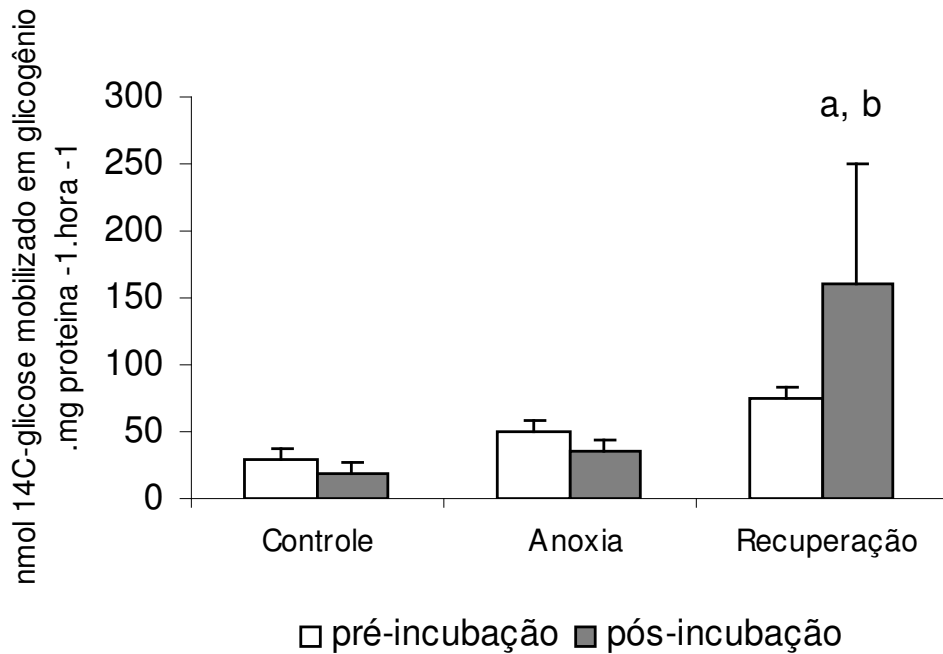


Figura 5: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de ¹⁴C-glicogênio nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com dieta rica em carboidratos (HC). O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. “a” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à anoxia.

Os resultados de mobilização do ¹⁴C-glicogênio em brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 6. Não foram verificadas diferenças significativas na concentração de ¹⁴C-glicogênio entre os grupos controle e anoxia após a

incubação em meio livre de glicose. Entretanto, no grupo recuperação a concentração de ^{14}C -glicogênio foi cerca de 2,5 vezes maior ($p < 0,05$) quando comparada àquela obtida no grupo controle. Não foram encontradas diferenças significativas entre as duas dietas.

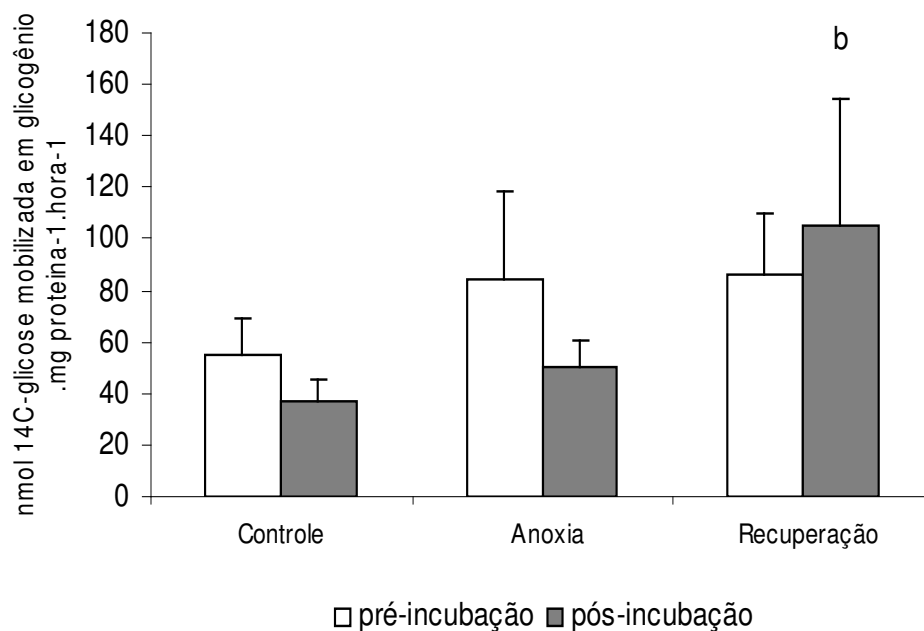


Figura 6: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com dieta rica em carboidratos HC. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. “a” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Os resultados de mobilização do ^{14}C -glicogênio em brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em proteína e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 7. Após o período de 1h de incubação em meio livre

de glicose, não foram encontradas nas brânquias anteriores diferenças significativas nas concentrações de ^{14}C -glicogênio entre os três grupos experimentais estudados.

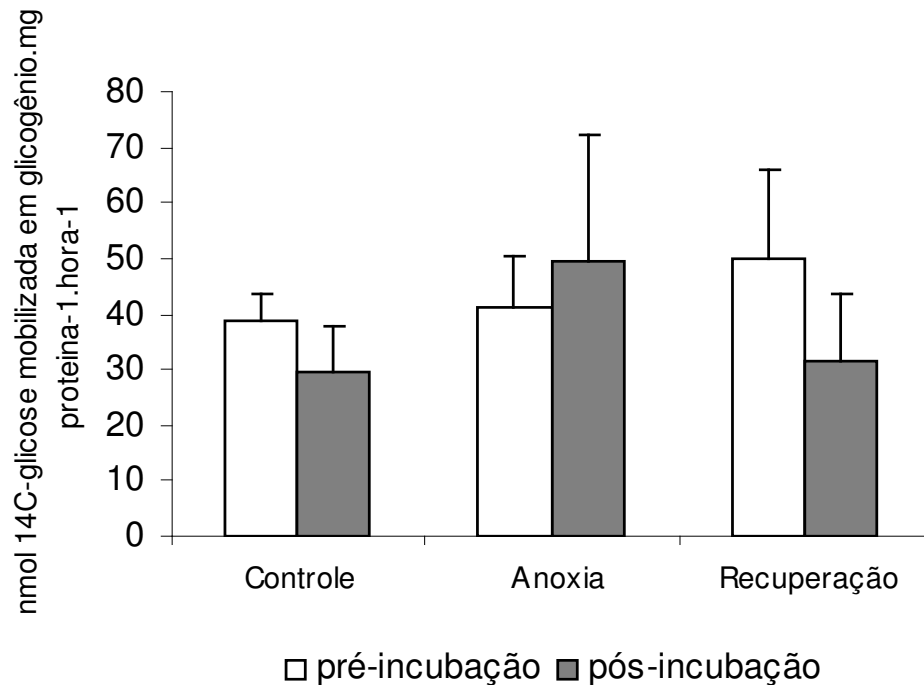


Figura 7: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com dieta rica em proteínas. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias.

Os resultados de mobilização do ^{14}C -glicogênio em brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em proteína e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 8. Após o período de 1h de incubação em meio livre de glicose, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de ^{14}C -glicogênio entre os três grupos experimentais estudados.

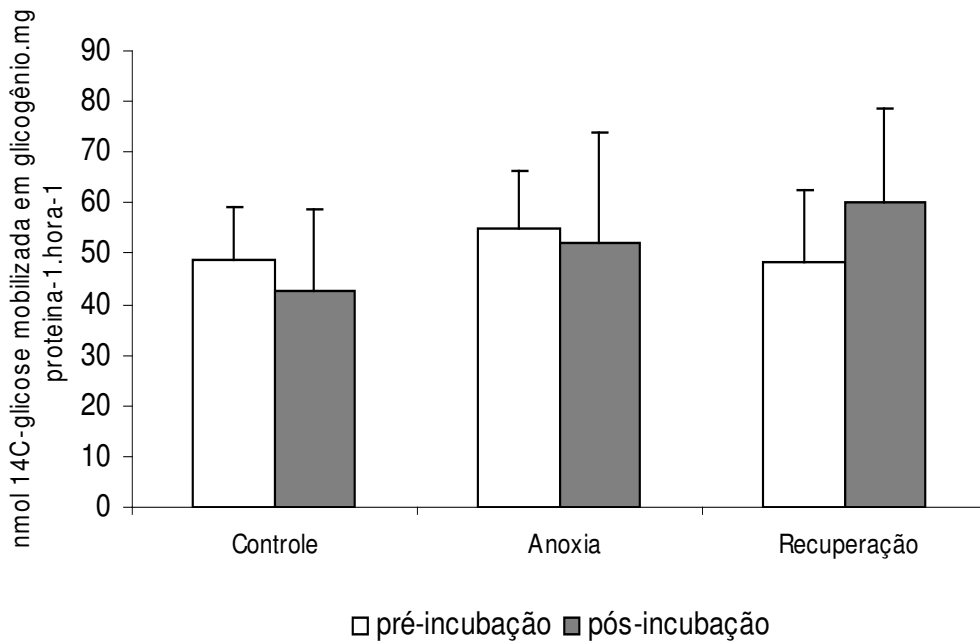


Figura 8: Efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a mobilização de glicogênio nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com dieta rica em proteínas. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias.

Síntese de Lipídios

Os valores de síntese de lipídios a partir de ^{14}C glicose nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 9. No grupo anoxia, em animais que receberam a dieta HP, a síntese de lipídios aumentou cerca de 6 vezes ($p < 0,05$) quando comparada àquela do controle. Na fase de recuperação da anoxia, a síntese de ^{14}C -lipídios reduziu 3 vezes quando comparada àquela observada no grupo anoxia, chegando a valores semelhantes àqueles verificados no grupo controle. A comparação entre as duas dietas demonstra que a síntese de ^{14}C -lipídios no grupo anoxia da dieta HP foi 2 vezes maior ($p < 0,05$) que aquela constatada no mesmo grupo em caranguejos alimentados com a dieta HC.

No grupo alimentado com a dieta HC não foram verificadas diferenças significativas de síntese de ^{14}C -lipídios entre os três tratamentos experimentais estudados.

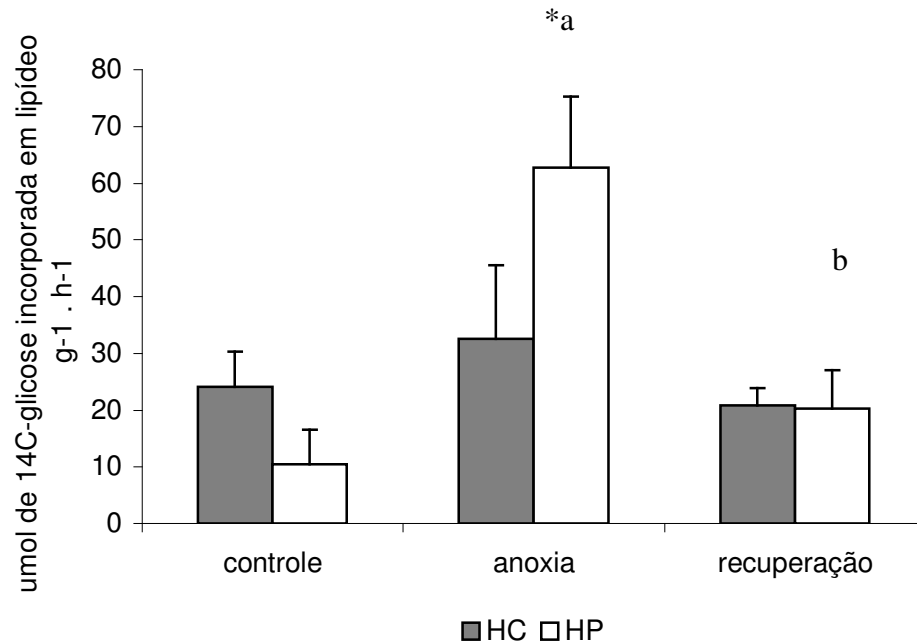


Figura 9: Síntese de lipídeos a partir de ^{14}C glicose nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. “a” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à anoxia. O asterisco (*) representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à outra dieta.

Os valores de síntese de lipídeos a partir de ^{14}C glicose nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 10. No grupo anoxia, em animais que receberam a dieta HP, a síntese de lipídios aumentou cerca de 3 vezes ($p < 0,05$) quando comparada àquela do controle. Na fase de recuperação da anoxia síntese de ^{14}C -lipídios reduziu 6 vezes quando

comparada àquela observada no grupo anoxia, chegando a valores semelhantes àqueles verificados no grupo controle. A comparação entre as duas dietas mostra que a síntese de ^{14}C -lipídios no grupo anoxia da dieta HP foi 3 vezes maior ($p < 0,05$) que aquela constatada no mesmo grupo em caranguejos alimentados com a dieta HC.

No grupo alimentado com a dieta HC não foram verificadas diferenças significativas de síntese de ^{14}C -lipídios entre os três tratamentos experimentais estudados.

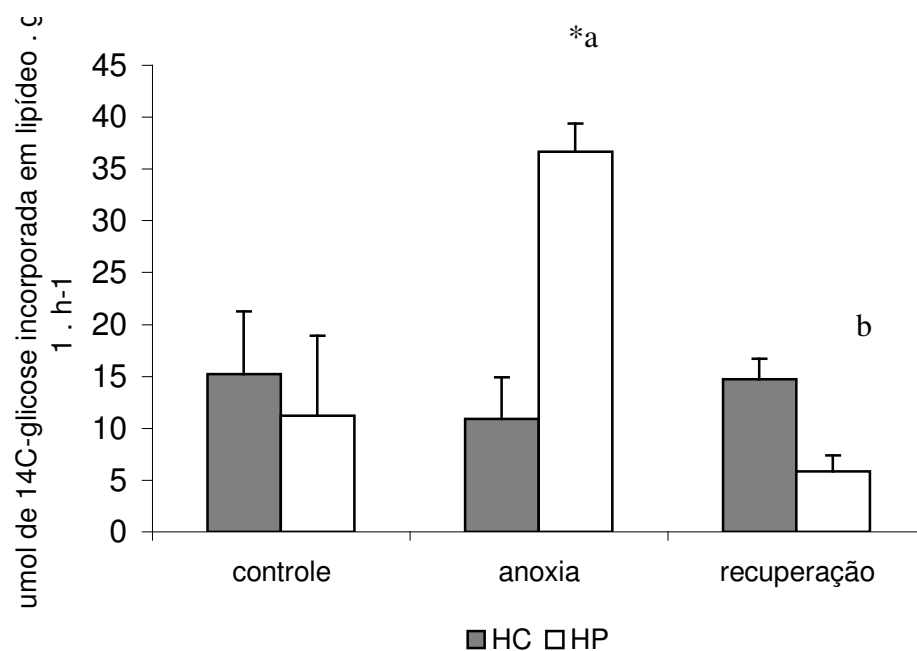


Figura 10: Valores síntese de lipídios a partir de ^{14}C glicose nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. “a” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à anoxia. O asterisco representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à outra dieta.

Formação de $^{14}\text{CO}_2$

Em normóxia (controle), a formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias posteriores e anteriores do grupo alimentado com dieta rica em proteínas foi 5 e 10 vezes maior ($p < 0,05$), respectivamente, que aquela verificada nas brânquias posteriores e anteriores do grupo HC.

Os valores de formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 11. Em caranguejos alimentados com dieta HP, a anoxia de 1h não alterou significativamente a formação de $^{14}\text{CO}_2$ tanto no grupo HP como naquele mantido com a dieta HC. Entretanto, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no grupo HP submetido à recuperação diminuiu 39% ($p < 0,05$) em relação ao grupo submetido à anoxia. No grupo HC, a recuperação de 3h não alterou significativamente a formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias posteriores. A comparação entre as duas dietas mostra que os grupos controle e recuperação da dieta HP são 80% e 81%, respectivamente, maiores ($p < 0,05$) que aqueles verificados nos grupos controle e recuperação da dieta HC.

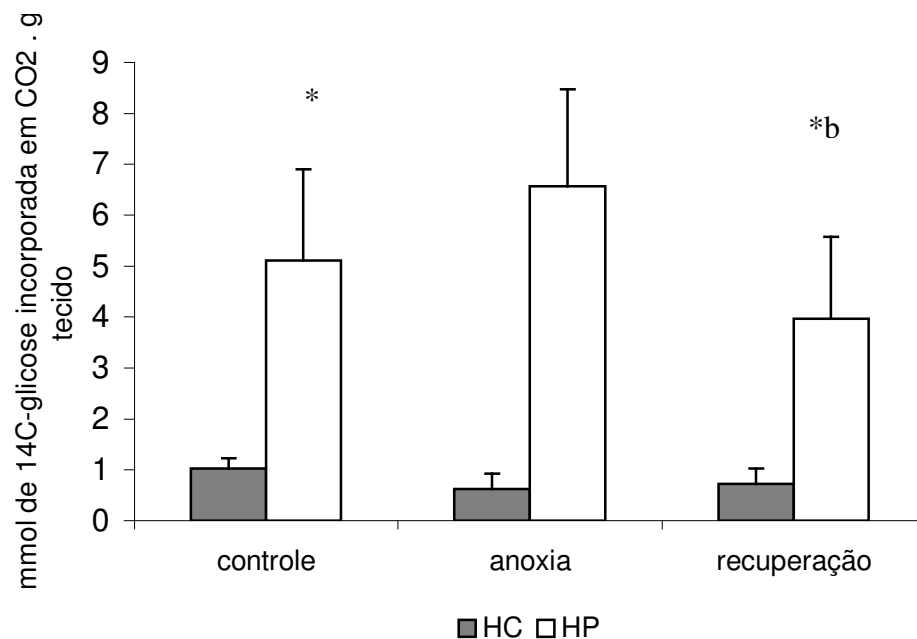


Figura 11: Formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias posteriores de *C. granulatus* alimentados com a dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à 1h de anoxia e a 3 h de recuperação. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. “b” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à anoxia. O asterisco representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à outra dieta.

Os valores de formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias anteriores de *C. granulatus* previamente alimentados com dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação podem ser vistos na figura 12. Nos caranguejos alimentados com a dieta HP 1h de anoxia não alterou significativamente a formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias anteriores. Entretanto, no grupo HP em recuperação, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ foi 59% e 60% menor, quando comparada àquelas obtidas nos grupos anoxia e controle, respectivamente.

Nos caranguejos mantidos com a dieta HC não foram verificadas alterações significativas de formação de $^{14}\text{CO}_2$ entre os três grupos experimentais estudados.

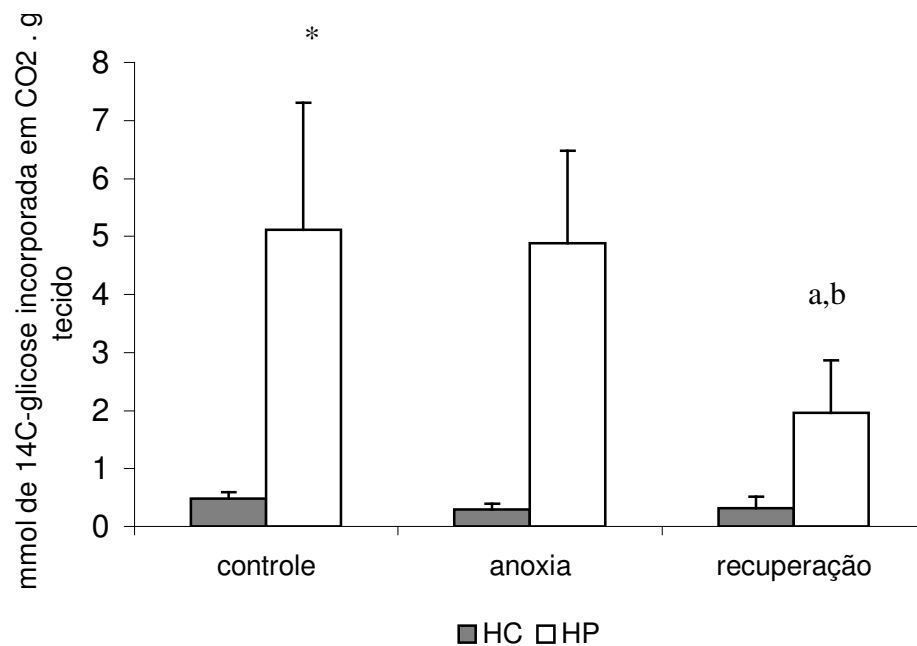


Figura 12: Formação de $^{14}\text{CO}_2$ nas brânquias anteriores de *C. granulatus* alimentados com a dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos à 1h de anoxia e a 3 h de recuperação. O número de animais em cada ponto foi de 3-9. As colunas representam as médias e as barras transversais representam os desvios padrões das médias. “a” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. “b” representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à anoxia. O asterisco representa diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à outra dieta.

Na tabela 2 estão representados os valores de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos alimentados com a dieta HC ou HP e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação. Tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores, o grupo HC mostrou uma concentração de glicogênio 2-3 vezes ($p > 0,05$) maior que aquela verificada nos caranguejos alimentados com a dieta HP.

Nas brânquias posteriores de animais alimentados com dieta HP a anoxia por 1h reduziu significativamente ($p < 0,05$) a concentração de glicogênio. O período de 3h em

normóxia não foi suficiente para que os níveis de glicogênio nas brânquias posteriores do grupo HP voltassem a valores semelhantes aqueles do grupo controle.

Nas brânquias posteriores do grupo HC a anoxia reduziu cerca de 1,5 vezes ($p>0,05$) os níveis de glicogênio. Contudo, a recuperação de 3h aumentou 2 e 4 vezes ($p<0,05$) a concentração de glicogênio nas brânquias posteriores do grupo HC, quando comparadas àquelas obtidas nos grupos controle e anoxia, respectivamente.

Nas brânquias anteriores do grupo HP a anoxia diminuiu ($P>0,05$) a concentração de glicogênio e a recuperação por um período de 3h não foi capaz de aumentar os valores de glicogênio neste tecido, que se mantiveram semelhantes aqueles constatados no grupo anoxia. No grupo HC a anoxia não alterou significativamente a concentração de glicogênio nas brânquias anteriores. Entretanto, a recuperação de 3h incrementou (cerca de 5x) significativamente os valores de glicogênio neste tecido, quando comparados àquelas obtidos no grupo anoxia.

Na tabela 3 estão representados os valores de glicose na hemolinfa de caranguejos alimentados com a dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos à 1h de anoxia e à 3h de recuperação.

Os animais do grupo HC submetidos à anoxia aumentaram significativamente ($p<0,05$) os valores de glicose hemolinfática. Entretanto, a recuperação por 3h diminuiu em 50% ($p<0,05$) os valores de glicose na hemolinfa quando comparados àquelas obtidos no grupo anoxia, porém em relação ao grupo controle a concentração de glicose ainda manteve-se significativamente mais elevada.

No grupo HP a anoxia também elevou significativamente os valores de glicose na hemolinfa. Contudo, a recuperação de 3h foi suficiente para que a concentração de glicose hemolinfática chegasse a valores semelhantes àquelas verificados no grupo controle HP.

A comparação dos valores de glicose hemolinfática entre os grupos HP e HC mostram nas 3 situações experimentais estudadas concentrações significativamente maiores no grupo alimentados com a dieta HC.

Tabela 2 – Efeito da anoxia e da recuperação sobre a concentração de glicogênio nas brânquias posteriores e anteriores de *C. granulatus* alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP). A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos foi expressa em mg.g^{-1} de tecido úmido.

GRUPOS	Brânquia Posterior		Brânquia Anterior	
	HC	HP	HC	HP
CONTROLE	424,8±150,6 (3)	251,8±130 (3)	289,3±190,6 (3)	112,2±31,1 (3)
ANOXIA	266,8±174,5 (4)	86,5±76 a (3)	137,9±106 (3)	34,7±14,4 (3)
RECUPERAÇÃO	962,4±207,3 ab (3)	65,5±28,5 a (3)	737,7±363,3 b (3)	34,1±28,8 (3)

Os valores são expressos em médias \pm desvio padrão. “a” indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. “b” significa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação à anoxia. O número de animais utilizado em cada experimento está entre parênteses.

Tabela 3 – Efeito da anoxia e da recuperação sobre a concentração de glicose na hemolinfa de *C. granulatus* alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP).

GRUPOS	HC (mmol.L)	HP (mmol.L)
CONTROLE	2,18 ± 1,2 (7)	1,16 ± 0,4 (8)
ANOXIA	12,6 ± 2,1 ^{a,*} (5)	7,43 ± 3,6 ^a (8)
RECUPERAÇÃO	6,38 ± 2,2 ^{a,*} (8)	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. Asterisco significa diferença significativa em relação à outra dieta. O número de animais utilizado em cada experimento está entre parênteses.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A glicose é um dos substratos energéticos mais importantes em crustáceos e sua utilização em diferentes situações fisiológicas tem sido estudada nesta classe de invertebrados (Chang e O' Connor, 1983).

A composição das dietas administradas aos caranguejos parece não afetar a captação de glicose, a síntese de lipídios totais e a síntese e mobilização de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores dos caranguejos em normóxia (controles). Entretanto, nos animais controles alimentados com a dieta HP, a oxidação de glicose seria uma importante via de geração de energia, justificando, em parte, a menor concentração de glicogênio verificada nas brânquias anteriores e posteriores quando comparada àquela verificada nas brânquias do grupo HC.

Em normóxia, as brânquias posteriores apresentam níveis de glicogênio 47% e 124% maiores nos grupos HC e HP, respectivamente, quando comparados àqueles verificados nas brânquias anteriores. Esta maior concentração de glicogênio pode ser explicada pela diferença funcional e estrutural entre as brânquias anteriores e posteriores. As brânquias anteriores apresentam um epitélio do tipo respiratório. Já nas brânquias posteriores, a atividade osmorreguladora é predominante e dependendo da salinidade do meio no qual se encontra o animal, o processo de transporte de cloreto de sódio pode ser ativado ou inibido (Genovese e cols., 2000; Luquet e cols., 2002).

Os resultados do presente trabalho demonstram que as vias de metabolização da glicose em brânquias anteriores e posteriores durante a anoxia e a fase de recuperação da anoxia são influenciadas pela composição da dieta previamente administrada aos caranguejos.

Para diversos animais, como o *C. granulatus*, o acesso ao oxigênio ambiental é intermitente. Este caranguejo é semi-terrestre e habita as zonas meso e supra litorâneas de estuários da costa brasileira, onde suportam episódios diários de falta de oxigênio durante suas incursões terrestres ou quando permanecem em suas tocas durante os meses de inverno (Botto e Irigoyen, 1980; Turcato, 1990).

Em *C. granulatus*, estudos prévios demonstraram que os conteúdos de carboidratos e de proteínas das dietas administradas aos caranguejos induziam diferentes ajustes metabólicos no hepatopâncreas e no músculo em resposta à anoxia (Oliveira e cols., 2001; Marqueze e cols., 2006).

Os resultados deste trabalho demonstram que na primeira hora de anoxia ambiental, tanto nos animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos como naqueles mantidos com a dieta de proteínas, ocorre um aumento na concentração de glicose hemolinfática de 6 e 6,4 vezes, respectivamente, sugerindo que a mobilização de glicose dos tecidos excede a sua utilização na via glicolítica, determinando o acúmulo de glicose na hemolinfa. Na literatura, alguns trabalhos em crustáceos demonstraram que a exposição dos animais à hipóxia ou à anoxia ambiental provoca hiperglicemia (Aardt, 1988; Gonçalves, 1993; Anderson e cols., 1994; Zou e cols., 1996; Hervant e cols., 1997).

A anoxia por 1h não afetou a capacidade de captação de glicose e de síntese e mobilização de glicogênio em ambas as brânquias dos grupos HC e HP. No hepatopâncreas de *C. granulatus*, Oliveira e cols. (2001) verificaram diminuição na captação de glicose e na síntese e mobilização de glicogênio somente após 2h em anoxia.

Lutz e Storey (1997) sugerem que tanto vertebrados como invertebrados apresentam uma resposta bifásica à redução da concentração de O₂ ambiental. A primeira conduziria à ativação da via glicolítica para manter ou aumentar a produção de ATP, já que as vias de

produção dependentes de O₂ estariam significativamente reduzidas. A segunda levaria à redução da taxa metabólica o que possibilitaria o uso gradual das reservas endógenas e a sobrevivência por períodos prolongados de hipóxia severa ou anoxia como ocorre em tartarugas, caracóis terrestres e bivalves (Guppy e cols., 1994; Churchill e Storey, 1989).

Em *C granulatus*, a atividade da enzima piruvato quinase no hepatopâncreas e no músculo aumenta significativamente após 1h de anoxia em caranguejos alimentados com a dieta HP, sugerindo uma aumentada atividade glicolítica (Marqueze e cols., 2006). Supondo que nas brânquias anteriores e posteriores de *C granulatus* alimentados com a dieta HP à atividade glicolítica também estaria aumentada, a glicose via di-idroxiacetona-P seria convertida a glicerol-3-P pela glicerofosfato desidrogenase com formação de triacilglicerol (Festuccia e cols., 2002). Esta via de formação de triacilglicerol explicaria a aumentada capacidade de formação de lipídios totais a partir de ¹⁴C-glicose em brânquias anteriores e posteriores de caranguejos alimentados com a dieta HP e submetidos à 1h de anoxia. No grupo HP, a capacidade de oxidação de glicose não sofreu alteração durante a anoxia, explicando o desvio desta hexose para a síntese de lipídios.

Em ratos em normóxia alimentados com uma dieta HP ocorre uma diminuição da capacidade glicolítica e a síntese de triacilglicerol no tecido adiposo marrom dá-se via gliceroneogênese, devido à prolongada ausência de carboidratos na dieta (Festuccia e cols., 2002). A hipótese do aumento de síntese de lipídios no grupo HP ter ocorrido somente quando o caranguejo encontra-se em anoxia, pois seria quando ocorre aumento da atividade glicolítica, deve ser testada em experimentos posteriores.

Comparando-se as duas dietas verifica-se que na dieta HP a diminuição da concentração de glicogênio nas brânquias posteriores e anteriores foi 1,6 e 3 vezes maior, respectivamente, que aquela verificada nos caranguejos mantidos com a dieta HC. Em

brânquias de *C. granulatus*, a concentração de glicose livre é significativa (Oliveira, 1998; Schein, 1999; Chittó, 2000). Oliveira (1998) verificou em brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus* alimentados com a dieta HC uma redução marcante dos níveis de glicose livre após 1h de anoxia. Desta forma, nos caranguejos do grupo HC as reservas de glicose livre e de arginina-fostato seriam utilizadas como substratos energéticos durante a anoxia de 1h. Contudo, será necessária a determinação dos valores de arginina fosfato para confirma esta hipótese.

Após a anoxia, o processo de recuperação é de grande importância funcional, pois é neste período que as reservas energéticas são restauradas e os produtos finais são metabolizados ou removidos dos organismos.

Nos caranguejos alimentados com a dieta HP, a glicose na hemolinfa retorna a valores semelhantes àqueles verificados no grupo controle após 3h de recuperação. Contudo, este período em normóxia não foi suficiente para restaurar as concentrações de glicogênio nas brânquias anteriores e posteriores dos caranguejos do grupo HP. Após o período de recuperação de 3h, provavelmente, a diminuição na captação de glicose nas brânquias anteriores e a manutenção da relação T/M de captação em brânquias posteriores sejam as causas dos baixos níveis de glicogênio verificados no grupo HP. Além disso, nas brânquias do grupo HP, a capacidade de mobilização de glicogênio na fase de recuperação é semelhante aquela dos grupos controle e anoxia. Marqueze e cols. (2006) verificaram em músculo de *C. granulatus* que 3h de recuperação, após 1h de anoxia, também não foram suficientes para o retorno da concentração de glicogênio a valores semelhantes aqueles do grupo controle.

No processo de recuperação, o fluxo de substratos é re-direcionados para a restauração das reservas energéticas. Provavelmente, na fase de recuperação, a diminuição da concentração de glicose na hemolinfa no grupo HP deva-se ao aumento da utilização de

glicose por outros tecidos ou pelo gasto energético devido ao aumento da atividade locomotora do animal. 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.

Oliveira e cols. (2001) sugerem que, em hepatopâncreas de *C. granulatus* mantidos com a dieta HP e submetidos à recuperação de 12h após anoxia de 8h, a captação de glicose ocorre nas primeiras horas de recuperação. Os mesmos autores constataram somente às 12h de recuperação um aumento significativo da síntese de glicogênio no hepatopâncreas dos caranguejos alimentados com a dieta HP.

No grupo de caranguejos alimentados com a dieta HC, os níveis de glicose na hemolinfa reduzem cerca de 50% na recuperação, contudo, não retornam a valores semelhantes aqueles do grupo controle; apesar da manutenção na capacidade de captação de glicose e o aumento da capacidade de síntese de glicogênio nas brânquias posteriores.

Em *C. granulatus* submetido à anoxia por diferentes períodos ocorre um aumento marcante dos níveis de lactato na hemolinfa (Oliveira e cols. 2004; Marqueze, 2004). Chittó (2005) demonstrou que as brânquias anteriores e posteriores de *C. granulatus* possuem capacidade gliconeogênica a partir de aminoácidos e de glicerol. Assim, o marcante aumento de glicogênio em ambas as brânquias do grupo HC, verificado neste trabalho durante a fase de recuperação, provavelmente, seja via gliconeogênese a partir de lactato, pois os níveis deste metabólito diminuem durante o processo de recuperação (Oliveira e cols., 2004).

Nas brânquias anteriores e posteriores do grupo HC verifica-se, após 1h de incubação em meio livre de glicose, um aumento da incorporação de ^{14}C -glicose em ^{14}C -glicogênio, indicando que durante o período de recuperação a capacidade de mobilização de glicogênio nestes tecidos estaria inibida.

Apesar dos níveis elevados de glicose na hemolinfa, o processo de recuperação não alterou significativamente a capacidade de síntese de lipídios ou formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose em ambas as brânquias do grupo HC.

Os resultados do presente trabalho mostram que em *C. granulatus* a glicose foi utilizada por diferentes vias durante o estresse anóxico e a fase de recuperação da anoxia. Entretanto, a composição da dieta administrada por 15 dias aos caranguejos modifica o fluxo deste substrato para vias diferenciadas, alterando, assim, o padrão de resposta metabólica ao estresse anóxico e à fase de recuperação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aardt, W. J. Van. 1988. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. *Comp. Biochem. Physiol.*, 91A: 299-304.
- 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.
- Barnes, R.D. 1990. *Zoologia dos Invertebrados*. 4º edição, São Paulo, Editora Roca.
- 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.
- Boschi, E.E. 1964. Los crustáceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. *Bol Inst Biol. Mar (Mar del Plata)* 6:1-76.
- 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 Ecologia Bentonica y Sedimentologia de la Plataforma Continental del Atlántico Sur, UNESCO, Montevideo, Uruguay. 161-169.
- Bourdier, G.G., Amblard, C.A. 1989. Lipids in *Acanthodiptomus denticornis* during starvation and feed on three diferent 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.
- Bromberg, E., 1992. Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão. Máster thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
- Bishop, 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.

- Calado R, Rosa R, Nunes M, et al. 2005. Amino and fatty acid dynamics of *Lysmata seticaudata* (Decapoda : Hippolytidae) embryos during early and late reproductive season *Marine Biology* 147 (2): 341-351
- Castilho, C.P., Martins, I.A., Bianchini, A. 2001. Gill Na⁺,K⁺-ATPase osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* V.256, p.215-227.
- 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.
- Chausson, F. e Regnault, M. 1995. Teneur en glycogène des branchies de *carcinus maenas* (Crustacé Décapode): caparaison entre branchies antérieures et postérieures. *Cah. Biol. Mar.* V.36, p.291-297.
- 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. 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.
- 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.
- Churchill, T.A., Storey, K.B. 1989. Intermediary energy metabolism during dormancy and anoxia in the land snail *Otala lactea*. *Physiol. Zool.*, 62 (5): 1015-1030
- 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.

- 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.
- 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 Physiol* 101A: 631-634.
- 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 Sapude, UFRGS.
- 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.
- Festuccia WTL Kawashita NH, , Brito MN, et al. 2002 Control of Glyceroneogenic activity in rat brown adipose tissue. *Am. J. Physiol* 285: R177-R182
- Freire, C.A., McNamara, J.C., Rosa, J.C., Greenes, L.J. 1995. Neuroendocrine controlo f osmotic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): free amino acid concentrations in the hemolymph. *Gen. Comp. Endoc.* V.100, p.83-91.
- 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.
- Geary, N., Langhans, W., Scharrer, E. 1981. Metabolic concometantas of glucagon-induced suppression os feeding in the rat. *Am. J. Physiol.*, 241(10): R330-335.
- Genovese, G., Luquet, C.M., Paz, D.A., Rosa, G.A., Pellerano, G.N. 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* under hyper-and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. *J. Anat.* V.197, p.239-246.
- 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., 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).
- Guppy, M.; Fuerry, C.J.; Flaning, J.E. 1994. Biochemical principles of metabolic depression. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B (2/3): 175-189.
- 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.
- 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.
- Herreid, C.F., Full, R.J. 1988. Energetics and locomotion. In:Macmahon B.(ed). *Biology of Land Crabs*. Cambridge University Press, Cambridge. p337-377.
- Hervant, F., Renault, D. 2002. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organism. *J. Exp. Biol.* 205, 2079-2087.
- 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., 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., Mathieu, J., Garin, D., Fréminet, A. 1995. Behavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus*

- rhenorhodanensis* and epigeal *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). *Physiol Zool* 68:223-244.
- Hill, R.W. 1980. Intercambios de oxígeno y dióxido de carbono: el transporte en los líquidos corporales. *Fisiología Comparada*. Reverte (ed) pág. 517-520.
- Hochachka, P.W., Lutz, P.L. 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia, tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol B* 130: 435-459.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, New Jersey. 538 p.
- 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.
- Huggins, A.K., Munday, K.A., 1968. Crustacean metabolism. *Adv. Comp. Physiol. Biochem*, 3,: 271-378.
- Kasschau MR, Ragland JB, Pinkerton SO, et al. 1984 a Time related changes in the free amino-acid pool of the sea-anemone, *bunodosoma-cavernata*, during salinity stress *Comparative Biochemistry and Physiology A-physiology* 79 (1): 155-159
- Kasschau MR, Skisak CM, Cook JP, et al. 1984 b Beta-alanine metabolism and high salinity stress in the sea-anemone, *bunodosoma-cavernata* *Journal of Comparative Physiology* 154 (2): 181-186
- Kucharski, L.C.; Schein, V.; Capp, E.; Da Silva, R.S.M. 2002. In Vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* V.125, p.256-263.
- 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.
- 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.

- Loret, S.M., Van Der Goor, N., Devos, P.E. 1989. Susoensions d'hemocytes et d'hepatopancreatocytess pour létude *in vitro* de la charge en glucose chez um Crustacé Décapodé. *Oceanis*, 15: 419-431.
- Luquet, C.M., Genovese, G., Rosa, G.A., Pellerano, G.N. 2002. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda: Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. *Mar Biol.* V.141, p.753-760.
- Luquet, C.M., Rosa, G.A., Ferrari, C.C., Enovese, G., Pellerano, G.N. 2000. Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. *Crustaceana*, v. 73, p. 53-67.
- Lutz, P.; Storey, K.B. 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In W. H. Dantzler (Ed.), *Comparative Animal Physiology*. Oxford University Pree, New York, p. 1479-1522.
- Mañe-Gazon, F., Dei-cas, E., Spector, B. H., Leymonte, J., 1974. Estudios sobre la biologia del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851: I osmorregulacion frente a cambios de salinidad. *Physis Secc. A33*, 163-171.
- Mantel, L.H.; Farne, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: Bliss, E.; Mantel, L.H. *The biology of crustacean*. London: Academic Press. V. 5, p.53-161.
- Marks, D., B., Marks, A.D., Smith, C.,M. 1996. *Basic Medical Biochemistry*. Baltimore: R.R. Donneley & Sons, 806p.
- 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 *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol. EUA*, v. 2, n. 332, p. 198-205.
- 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 federa do Rio Grande do Sul.
- Martins, H. 2003. Efeito da insulina sobre a atividade da enzima Na⁺-K⁺ATPase branquial, a síntese de proteína e captação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas:

Fisiologia)-Departamento de Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Matsushima O and Hayashi Y S 1992. Metablism of D- and L-alanine and regulation of intracellular free amino acid levels during salinity stress in a backish-water bivalve *Corbicula japonica* Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, V. 102 (3) p. 465-471
- Morris, S., Airriess, C.N. 1998. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. S. Afr. J. Zool. 33: 87-106.
- Nicol, S., Virtue, P., King, R., Davenport, S.R., Mcgaffin, A f., Nichos, P. 2004. Condition of *Euphausia crystallophias* off East Antactica in winter in comparison to other seasons. Deep-sea Research part II. 51 (17-19): 2215-2224.
- Odum, E P. 1985. Ecologia. Editora Interamericana, Rio de Janeiro, 435p.
- Okuma E, Abe H. 1994. Total d-amino and other free amino-acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. Comparative biochemistry and Physiology A-physiology 109 (1): 191-197
- 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.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. Mar Biol 139:335-342.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S.M. 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp Biochem Physiol B 127:375-381.
- Oliveira, G.T.; Da Silva, R.S.M. 1998. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. J. Exp. Biol.

- 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.
- Pasteur, L. 1861. Expériences et vues nouvelles sur la nature des fermentations. *Comp Rend Acad Sci* 52:12 60-1264.
- Pequeux, A. 1995. Osmotic Regulation in Crustaceans *Journal of Crustacean Biology* 15 (1): 1-60
- Péqueux, A.; e Gilles, R. 1984. Controlo f the extracellular fluid osmolality in crustaceans. In: Péqueux, A.; e Gilles, R.; Bolis, L. (ed), *Osmoregulation in estuarine and marine animals. Proc. 5 Conf. Eur. Soc. Comp. Physiol. Biochem. Taormina, Italy*, p.17-34. *Lecturo Notes on Coastal and estuarine studies*, v.9.
- 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* and *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese south coast. *Crustaceana* 75(9): 1095-1105.
- 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.
- 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.
- 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.
- Schmidt-Nielsen, K. 2002. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. 5º edição, São Paulo, Editora Santos.

- 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.
- 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.
- Thomas, J.A.; Schlender, K.K.; Lerner, J. 1968. A rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glycose. *Anal. Biochem.*, 25: 486-499.
- Thompson, R.K., Pritchard, A.W. 1969. Respiratory adaptations of the two burrowing crustaceans *Callinassa Californiensis* and *Upogebia pugettensis*. *Biol Bull* 136:274-287.
- Torres I.L.S., Camaro C.D., Silveira-Cucco S.N., Michalowski M.B., Corrêa J.B., Perry M.L.S., and Dalmaz C. 2001. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO₂ in hippocampal and cerebral cortex slices. *J Med Biol Res* 34:111-116.
- Trapp, M (2005). Efeitos do estresse hipo e hiperosmótico sobre as características do receptor à insulina e sobre a captação de glicose em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*. Porto Alegre: UFRGS, 2005. Tese de doutorado submetida ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia.
- 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.
- 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. 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, 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.
- Webster, K. A, 2003. Evolution of coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Biol.* 206, 2911-2922.
- Wellcomme, L. e Devos, P. 1991. Energy consumption in the perfused gills of the crab euryhaline *Eriocher sinensis* adapted to freshwater. *J. Exp. Zool.* V.257, p. 150-159.
- Withers, P.C. 1992. Blood. In: *Comparative animal physiology*. Saunders College Publishing, Orlando, Florida, pp.728-755.
- 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 *Erioccheir sinensis* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol A* 114:105-109.