

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

**RECEPTOR *INSULIN-LIKE* E TRANSPORTE DE NUTRIENTES ENERGÉTICOS EM  
*NEOHELICE GRANULATA*: SAZONALIDADE**

**Sandra Costa Valle**

**Porto Alegre, Agosto de 2008**

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

**RECEPTOR *INSULIN-LIKE* E TRANSPORTE DE NUTRIENTES ENERGÉTICOS EM  
*NEOHELICE GRANULATA*: SAZONALIDADE**

**Sandra Costa Valle**

**Orientadora**

**Dra. Roselis Silveira Martins da Silva**

**Co-orientador**

**Dr. Luiz Carlos Kucharski**

**Tese de Doutorado submetida ao Curso de Pós  
Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte  
dos requisitos necessários à obtenção do grau de  
Doutor (a) em Ciências.**

**Porto Alegre, Agosto de 2008**

**Esta Tese é dedicada**

**A meu esposo Victor, pelo apoio incondicional, pelo  
incentivo constante e pela dedicação a nossa família**

**A meu filho Pedro, por aprender muito cedo o  
significado da palavra saudade**

**“ A gente sempre deve sair à rua como quem foge de casa,  
Como se estivessem abertos diante de nós todos os caminhos do mundo.  
Não importa que os compromissos, as obrigações, estejam ali...  
Chegamos de muito longe, de alma aberta e coração cantando!**

**Mário Quintana**

## AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Roselis Silveira Martins da Silva meu especial agradecimento pela oportunidade e orientação dedicada. Desde o início suas palavras e atitudes sempre foram incentivadoras. Obrigada pela compreensão, pelo estímulo e pelo exemplo profissional e pessoal.

Ao, Dr. Luiz Carlos Kucharski pela orientação, pela paciência, pelos inestimáveis e inúmeros ensinamentos durante a realização deste trabalho, pela dedicação profissional e por seu bom humor.

À Profa Dra Ilma Brum pela acolhida no seu laboratório, pela orientação na biologia molecular, pelos ensinamentos e pelo comprometimento.

À Dra Márcia Trapp pela colaboração, pela disponibilidade, pela paciência e pelos ensinamentos das técnicas de *binding* e fosforilação.

Ao Victor pelo carinho, pelo companheirismo, pela infinita compreensão e pelo exemplo pessoal e profissional.

Ao Pedro por sua alegria, por seu carinho e por suas constantes expressões de afeto.

A Vera Rutz pelos cuidados zelosos com o Pedro possibilitando dessa forma meu afastamento.

Ao colega José Eduardo por seu inestimável auxílio nas inúmeras coletas realizadas durante a execução deste trabalho e pela parceria nos experimentos de PCR.

Aos bolsistas de iniciação científica Gabriel Machado e Gabriela Pedroso pela amizade, pelo comprometimento e pelo auxílio valioso nos experimentos.

Aos colegas Ricardo Pelegrino e Alan Poppl pela parceria profissional, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade.

À Fabiana Ribon pela amizade e parceria.

Aos colegas do LAMEC Ubirajara Oliveira, Tiago Martins, Felipe Fernandes, Éric Kessler, Ana Chittó, Glauco Caon, Matheus Jahn, Vanessa Schein, Daniele Kaiser, Inajara Kist, Fábiana Ribarcki pelas conversas, auxílios e parceria.

À Miriam Krause que durante sua passagem pelo laboratório de biologia molecular se dedicou, de maneira espontânea, com paciência e extrema boa vontade a ensinar-me as técnicas experimentais para realização do PCR.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular Vanderlei e Gisele pela acolhida, pela paciência e pelo valioso auxílio nos experimentos.

À Profa Dra Maria Flávia por sua contribuição a realização deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação Fernando, Karine, Camila, Luana e Carla pelo auxílio quando foi necessário.

A Ritinha por seus estimados doces e salgados que muito auxiliaram nas horas de trabalho contínuo.

Aos meus avós Trademar e Victória pelo auxílio à minha formação e pelo carinho.

À amiga Karla Oliveira pela torcida e incentivo.

Aos amigos e familiares pela torcida.

Ao Prof. Marcos Perry por sua importante contribuição a minha formação acadêmica.

As gúrias do pensionato Mara, Ritinha e Jô pelas conversas e risadas.

Ao curso de Pós-graduação em Fisiologia, as secretárias Alice, Fabiana e Uira e a todos os colegas e professores por tornarem possível a realização desta Tese.

A todos aqueles que contribuíram em alguma etapa da realização deste trabalho. Obrigada!

A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

**RESUMO**

Mudanças sazonais nas condições ambientais alteram o ritmo sazonal endógeno com efeitos sobre a fisiologia e o comportamento de diversas espécies animais. Caranguejos estuarinos da espécie *Neohelice granulata* (Crustácea, Decapoda, Brachyura) são anualmente expostos a múltiplas condições estressantes a exemplo das variações de salinidade da água, pressão parcial de oxigênio, temperatura, pH, fotoperíodo, disponibilidade de alimentos, entre outras. Em crustáceos a insulina de mamífero estimula a atividade tirosina quinase do receptor *insulin/IGF I-like*, a fosforilação de proteínas citoplasmáticas como o substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1), o transporte de glicose, a glicogênese e a síntese lipídica, além disso, Kucharski e cols (2002) mostraram uma variação sazonal na ação do hormônio. Essas evidências motivam a investigação do sistema de sinalização *insulin/IGF I-like* e suas relações com as mudanças sazonais do meio ambiente em invertebrados aquáticos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da sazonalidade sobre a expressão, as características de ligação e a transdução do sinal insulínico, bem como, a captação de glicose e aminoácidos neutros em brânquias posteriores (BP), anteriores (BA) e músculo mandibular (MM) de *N. granulata* em seu ambiente natural. No presente trabalho mostrou-se, pela primeira vez, a expressão do gene *CGIRLTK* (*Chasmagnathus granulata* Insulin Receptor Like Tyrosine Kinase) e sua variação sazonal em tecidos com diferentes características morfológicas e funcionais. Nas BP os mecanismos de modulação da via *insulin/IGF I-like* no verão mostraram-se diferentes, quando comparados àqueles verificados no inverno. No inverno o aumento da afinidade e da atividade tirosina quinase do receptor foi acompanhado de significativa elevação na expressão do gene *CGIRLTK*. Contudo, no verão o aumento na concentração de receptores e na fosforilação do substrato exógeno ocorreu paralelamente ao aumento da expressão do gene *CGIRLTK*. Já nas BA a sazonalidade não afetou a concentração de mRNA do *CGIRLTK* e as características de ligação ( $K_d$  e  $B_{max}$ ) e fosforilação do receptor tirosina quinase mostraram eventos similares àqueles verificados nas BP no inverno e verão, entretanto, na primavera, verificou-se uma resistência à insulina nesses órgãos. Quanto ao MM constatou-se elevada sensibilidade à insulina na primavera. Nessa estação a elevação da concentração de mRNA do *CGIRLTK* foi acompanhada do aumento da concentração de receptores, da afinidade do receptor ao hormônio e da atividade tirosina quinase do receptor. No presente trabalho a captação de 1-[ $^{14}C$ ] 2-deoxi-D-glicose (DG) foi marcadamente superior aquela de 3-O-[ $^{14}C$ ] metil-D-glicose (MG) nas BP e BA de *N. granulata* em todas as estações. A maior captação de DG e de MG nas BP e BA ocorre na primavera e no verão, sugerindo, que o transporte de glicose, possivelmente, ocorra via GLUT nas brânquias. Em contraste ao observado nas brânquias, não se constatou diferenças marcantes entre a captação de DG e de MG no músculo nos meses de inverno, primavera e verão. É possível que no tecido muscular existam dois sistemas de transporte de glicose com diferentes propriedades cinéticas e moduladoras: via GLUT e via co-transporte de sódio. Concluindo, a sazonalidade dos fatores ambientais altera a expressão do gene *CGIRLTK*, as características de ligação e de transdução do sinal insulínico, o transporte de nutrientes e de osmólitos em brânquias anteriores e posteriores e em músculo de *N. granulata*.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Alinhamento da seqüência de peptídeos representantes da superfamília da insulina em invertebrados e vertebrados.

**Figura 2:** Comparação da seqüência de aminoácidos do CIR (*C.granulatus insulin-like receptor*), com outros membros da super-família de IR (insulin receptor).

**Figura 3.** Substâncias intracelulares envolvidas com a transdução do sinal da insulina – comparação entre *D. melanogaster*, *C. elegans* e mamíferos.

**Figura 4:** Efeito biológico da insulina/IGF-1 sobre o metabolismo energético, crescimento e diferenciação celular e expressão de genes em mamíferos.

**Figura 5:** Estuário de Tramandaí-RS, local de coleta do *N.granulata* (acima à direita).

**Figura 6:** Figura de amostras de brânquias anteriores, posteriores e músculo mandibular excisadas de *N.granulata*.

**Figura 7:** PCR do gene CGIRLTK, analisado em gel de agarose (low melting 2%), do tecido branquial posterior de *N.granulata*.

**Figura 8:** Sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* insulin receptor like tyrosine kinase) em brânquias posteriores de *N.granulata*.

**Figura 9:** PCR do gene CGIRLTK, analisado em gel de agarose (low melting 2%), do tecido branquial anterior (BA) de *N.granulata*.

**Figura 10:** Sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* insulin receptor like tyrosine kinase) em brânquias anteriores de *N.granulata*.

**Figura 11:** PCR do gene CGIRLTK, analisado em gel de agarose (low melting 2%), do tecido muscular de *N.granulata*.

**Figura 12:** Sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* insulin receptor like tyrosine kinase) em músculo mandibular de *N.grnulata*.

**Figura 13:** Porcentagem de ligação total da  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de brânquias posteriores, de brânquias anteriores e de músculo de *N.grnulata* nas quatro estações do ano.

**Figura 14:** Curvas representativas da competição da insulina não marcada com a  $^{125}\text{I}$ -insulina pela ligação às membranas de brânquias posteriores de *N.grnulata*: comparação sazonal

**Figura 15:** Curvas representativas da competição da insulina não marcada com a  $^{125}\text{I}$ -insulina pela ligação às membranas de brânquias anteriores de *N.grnulata*: comparação sazonal

**Figura 16:** Curvas representativas da competição da insulina não marcada com a  $^{125}\text{I}$ -insulina pela ligação às membranas de músculo mandibular de *N.grnulata*: comparação sazonal

**Figura 17:** Análise de Scatchard dos dados das curvas de competição da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de brânquias posteriores de *N.grnulata*: comparação sazonal

**Figura 18:** Análise de Scatchard dos dados das curvas de competição da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de brânquias anteriores de *N.grnulata*: comparação sazonal

**Figura 19:** Análise de Scatchard dos dados das curvas de competição da ligação de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de músculo de *N.grnulata*: comparação sazonal

**Figura 20:** Fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1 em preparações de membrana plasmática de brânquias posteriores de *Neohelice granulata*.

**Figura 21:** Fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1 em preparações de membrana plasmática de brânquias anteriores de *Neohelice granulata*.

**Figura 22:** Fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1 em preparações de membrana plasmática de músculo mandibular de *Neohelice granulata*.

**Figura 23:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxi-D-glicose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] metil-D-glicose (MG) em brânquias posteriores de *N.grnulata*.

**Figura 24:** **Figura 23:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxi-D-glicose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] metil-D-glicose (MG) em brânquias anteriores de *N.grnulata*.

**Figura 25:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxi-D-glicose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] metil-D-glicose (MG) em músculo mandibular de *N.grnulata*.

**Figura 26:** Efeito da sazonalidade sobre a concentração de glicose na hemolinfa de *N.grnulata*.

**Figura 27:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de [<sup>14</sup>C]-MeAIB em brânquias posteriores (**A**), brânquias anteriores (**B**) e músculo mandibular (**C**) de *N.grnulata*.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Características dos oligonucleotídeos para reação de PCR

**Tabela 2:** Medidas de osmolalidade, de pH e de temperatura do ambiente estuarino e de pH e de osmolalidade da hemolinfa de *N.granulata*

**Tabela 3:** Porcentagem de Ligação Específica da  $^{125}\text{I}$ - insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Hormônio em Membranas de Brânquias Posteriores de *N.granulata*: sazonalidade

**Tabela 4:** Porcentagem de Ligação Específica da  $^{125}\text{I}$ - insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Hormônio em Membranas de Brânquias Anteriores de *N.granulata*: sazonalidade

**Tabela 5:** Porcentagem de Ligação Específica da  $^{125}\text{I}$ - insulina em Presença de Diferentes Concentrações de Hormônio em Membranas de Músculo Mandibular de *N.granulata*: sazonalidade








**Tabela 6:** Características Sazonais da Constante de Dissociação-  $K_d$  (pM / mg de proteína) em Brânquias Posteriores (BP), Brânquias Anteriores (BA) e Músculo Mandibular de *N.granulata*.







**Tabela 7:** Características Sazonais da Capacidade Máxima de Ligação-  $B_{\text{max}}$  (pM / mg de proteína) em Brânquias Posteriores (BP), Brânquias Anteriores (BA) e Músculo Mandibular de *N.granulata*.

**Tabela 8:** Correlação entre a osmolalidade da hemolinfa e a constante de dissociação-  $K_d$  para insulina, em brânquias posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e músculo mandibular (MM) de *N.granulata*.

**Tabela 9:** Correlação entre a osmolalidade da hemolinfa e a fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e músculo mandibular (MM) de *N.granulata*.

## Sumário

 <b>RESUMO</b>	<b>08</b>
 <b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>10</b>
 <b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>12</b>
 <b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
 <b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
1. Objetivo Geral	<b>48</b>
2. Objetivos Específicos	<b>49</b>
 <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>50</b>
1. Materiais	<b>51</b>
2. Coleta de Animais e Medidas de Fatores Abióticos do Ambiente Estuarino	<b>52</b>
3. Procedimentos Experimentais	<b>53</b>
3.1 Medida da Osmolalidade e pH da Hemolinfa	<b>53</b>
3.2 Preparo dos tecidos para obtenção de membranas plasmáticas	<b>54</b>
3.3 Obtenção das membranas plasmáticas	<b>54</b>
3.4 Ensaio de ligação da <sup>125</sup> I-insulina em presença de diferentes concentrações de insulina regular humana	<b>55</b>
3.4.1 Análise de Scatchard: medida da interação hormônio-receptor	<b>57</b>
3.5 Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr 4:1)	<b>60</b>
3.6 Captação de Glicose e Aminoácidos Neutros	<b>61</b>
3.7 Extração do RNA total	<b>62</b>
3.8 Determinação do mRNA da região tirosina quinase do receptor <i>insulin-like</i> de brânquias anteriores, posteriores e de músculo mandibular: análise por PCR (polymerase chain reaction)	<b>63</b>
4. Determinações Bioquímicas	<b>64</b>
5. Análise Estatística	<b>65</b>
 <b>RESULTADOS</b>	<b>66</b>
1. Avaliação Sazonal de Fatores Abióticos do Ambiente Estuarino e da Osmolalidade e do pH da Hemolinfa de <i>N.granulata</i>	<b>67</b>
2. Expressão do CGIRLTK ( <i>Chasmagnathus granulatus</i> Insulin Receptor Like Tyrosine Kinase) nos tecidos branquial e muscular: alteração sazonal	<b>69</b>
3. Estudos de Ligação da <sup>125</sup> I-insulina às Membranas Celulares de Brânquias Anteriores e Posteriores e Músculo de <i>N.granulata</i>	<b>73</b>
3.1 Porcentagem de Ligação Total da <sup>125</sup> I-insulina às Membranas Celulares de Brânquias Posteriores, de Brânquias Anteriores e de Músculo Mandibular	<b>73</b>

3.2 Porcentagem de Ligação Específica da <sup>125</sup> I-insulina às Membranas Celulares de Brânquias Posteriores, de Brânquias Anteriores e de Músculo Mandibular: alteração sazonal	74
3.3 Curvas Representativas da Competição de Insulina Não Marcada e <sup>125</sup> I-insulina Pela Ligação s Membranas Celulares de Brânquias e Músculo de <i>N.granulata</i> : sazonalidade	77
3.4 Características de ligação da <sup>125</sup> I- insulina em membranas de brânquias e músculo de <i>N.granulata</i> : análise de Scatchard	81
4. Atividade Tirosina Quinase do CGIRLTK: alteração sazonal	87
5. Sazonalidade da Captação de Glicose, da Glicemia e da Captação de Aminoácidos Neutros No Tecido Branquial e Muscular de <i>N.granulata</i>	92
 <b>DISCUSSÃO</b>	99
1. Receptor <i>insulin-like</i> de <i>Neohelice granulata</i> : sazonalidade	102
2. Captação de nutrientes energéticos em <i>Neohelice granulata</i> : sazonalidade	115
 <b>CONCLUSÃO</b>	125
 <b>PERSPECTIVAS</b>	127
 <b>REFERÊNCIAS</b>	129
 <b>TRABALHOS DESENVOLVIDOS</b>	149
 <b>ANEXO</b>	153

Trabalho submetido à publicação: Seasonality of Glucose and Neutral Amino Acid Uptake in Estuarine Crab *Neohelice granulata*: a relationship with ambiental parameters

**Of the four seasons, none lasts forever; of the days some are long and  
some are short.**

Sun Tzu 6:31

# INTRODUÇÃO



---

Na biosfera existem dois grandes ritmos: *i*) o diário- determinado pelo movimento de rotação da terra e *ii*) o anual- determinado pelo movimento de translação da terra (Bradshaw e Holzapfel., 2007a). Em plantas e animais o ritmo circadiano identifica o ciclo claro:escuro da terra e coordena adequadas respostas bioquímicas, fisiológicas e comportamentais dos organismos. Contudo, o processo de adaptação das espécies às condições ambientais determinou o surgimento biológico de um ritmo ciclo-anual (sazonal) o qual sincroniza processos endógenos as alterações na duração e na intensidade dos ciclos de claro:escuro e de temperatura ambiental (Underwood e cols., 1997; Bradshaw e Holzapfel., 2007a;b). Foi proposto que o ritmo endógeno sazonal possibilita aos organismos o enfrentamento das variações climáticas características das estações. Esse ritmo biológico a cada estação do ano pode sofrer a influência de variações da intensidade da luz, da temperatura ambiente, da umidade, da disponibilidade de nutrientes, entre outros (Bradshaw e Holzapfel., 2007b). Entretanto, essas variações não impedem o ritmo endógeno sazonal não prejudicando assim, a funcionalidade e a vida dos organismos ao longo de toda uma estação (Underwood e cols., 1997; Bradshaw e Holzapfel., 2007 b).

O efeito das variações sazonais de fatores ambientais sobre os sistemas biológicos tem sido investigado em mamíferos, aves, répteis, anfíbios, peixes e diversas classes de invertebrados (Underwood e cols., 1997; Bradshaw e Holzapfel., 2007a;b). Estudos realizados com primatas, roedores, pássaros e peixes, mostram que a variação anual de fatores como a temperatura e o fotoperíodo alteram os sistemas endócrinos. Dentre estes fatores, o fotoperíodo tem se mostrado imperativo e parece sincronizar o ritmo endógeno e os processos fisiológicos e bioquímicos, em vertebrados mamíferos e não mamíferos, através de mudanças neuro-endócrinas mediadas pela melatonina. Tais mudanças são bem descritas sobre o ciclo reprodutivo (2002; Bradshaw e Holzapfel., 2007b), e alguns trabalhos demonstram a interação com outros sistemas endócrinos (Donahoo e cols., 2000; Bunout e cols., 2003).

---

Tanto em vertebrados como em invertebrados múltiplos aspectos fisiológicos e comportamentais como a migração, a muda, a reprodução, exibem diferenças sazonais e contribuem para a preservação das espécies (Underwood e cols., 1997). Nos invertebrados, em particular nos artrópodes, às alterações sazonais do meio ambiente determinam que as espécies sejam capazes de alterar rapidamente seus processos bioquímicos e fisiológicos prevenindo ocasionais prejuízos à funcionalidade tecidual (Underwood e cols., 1997; Bradshaw e Holzapfel., 2007b).

Em crustáceos diversos estudos evidenciam uma variação sazonal do metabolismo frente às alterações bióticas e abióticas do meio ambiente (Bromberg 1992, Kucharski e Da Silva 1991b; Oliveira e cols., 2003; Novo e cols., 2005; Castiglioni e cols., 2006; Vinagre e cols., 2007; Oliveira e cols., 2007).

No crustáceo de água doce *Parastacus varicosus* a avaliação do metabolismo intermediário mostrou um padrão sazonal que estava relacionado à maturação das gônadas nas fêmeas e ao preparo à reprodução nos machos (Silva-Castiglioni e cols., 2007). Contudo, a exemplo de outros crustáceos decápodes, o teor de oxigênio na água, a temperatura e o fotoperíodo, também podem influir no metabolismo intermediário (Silva-Castiglioni e cols., 2007). Já no *Parastacus defossus*, Buckup e cols. (2008) mostraram as variações sazonais da composição bioquímica de diversos tecidos. Nesse trabalho a concentração de lipídios totais nas brânquias foi significativamente elevada no outono e reduzida na primavera. Já no músculo as concentrações de glicogênio foram elevadas no inverno e reduzidas no outono. Esses resultados indicam que no *Parastacus defossus* os carboidratos são a principal fonte energética no outono, período em que os animais são intensamente ativos.

No crustáceo *Ocypode quadrata*, Vinagre e cols. (2006) constataram uma modificação sazonal do metabolismo energético com uma significativa redução das concentrações de glicogênio e de lipídios (triglicerídeos e colesterol) da hemolinfa no verão e primavera, respectivamente. Nesse crustáceo, que habita solo arenoso ao

---

longo da costa do oceano atlântico, os lipídios da hemolinfa podem estar alterados em função do início do período reprodutivo, sendo utilizados na espermatogênese. Em *O. quadrata* machos houve uma redução do teor de glicogênio nas brânquias no outono; no verão as reservas de carboidratos do músculo e das gônadas diminuíram. Já o glicogênio pode variar sazonalmente em função da atividade locomotora justificando a redução verificada no verão.

As espécies de crustáceos que habitam áreas de estuários sofrem um controle seletivo e severo em função das variações extremas dos fatores ambientais característicos de cada estação do ano. Mudanças tanto comportamentais como estruturais e funcionais ocorrem nos organismos lacustres e estuarinos, capacitando-os a tolerar as oscilações físico-químicas do ambiente (Kinne, 1993). Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinho e límnic, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura de água e outros de completa exposição do substrato. Esses ecossistemas, que constantemente sofrem a influência de fatores oceanográficos, límnicos e meteorológicos, impõem à sua biota um elevado estresse ambiental. O estresse pode ser gerado tanto pelas variações extremas de fatores como salinidade e temperatura, bem como pela concentração de O<sub>2</sub> dissolvido no meio e pelos ciclos das marés (Bianchini e cols., 2008).

O caranguejo *Neohelice granulata* é uma típica espécie estuarina que evoluiu a partir de formas marinhas, situa-se sistematicamente na Superclasse Crustácea, Classe Malacostraca, Ordem Decapoda e Família Brachyura (Bianchini e cols., 2008). Este crustáceo habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o golfo de San Martin, na Argentina (Boschi, 1964). Em seu habitat, este caranguejo é encontrado entre os pisos supra e mesolitorâneos, em áreas inundáveis com ou sem vegetação halo-hidrófila, onde abre galerias ou tocas com profundidades variáveis de acordo com o

---

nível das marés e do lençol freático. Este procedimento garante a presença de água no fundo da toca e minimiza as amplitudes de variações de salinidade e temperatura ambiente (Turcato, 1990; Botto e Irigoyen, 1980). Os animais maiores, principalmente os machos, são facilmente encontrados em locais abertos, enquanto as fêmeas e animais jovens buscam refugio junto à vegetação ribeirinha formada, que é composta, principalmente, por juncos (Bond-Buckup e cols., 1991). O *N. granulata*, 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, porém quando exposto ao ar atmosférico diminui o consumo de oxigênio e reduz a mobilidade (Santos e cols., 1987). Em relação ao comportamento alimentar é uma espécie onívora-detritívora, a análise do conteúdo estomacal mostrou a presença de sedimentos e de restos de origem animal e vegetal, como também revelou diferenças quantitativas e qualitativas de alguns itens alimentares conforme a estação do ano (D’Incao e cols., 1990).

No caranguejo *N. granulata* Kucharski e Da Silva (1991b) constataram uma variação sazonal na concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios no músculo e no hepatopâncreas. Esses resultados indicam que variações ambientais e/ou da disponibilidade de alimentos durante as estações do ano alteram o padrão metabólico desse caranguejo. Ainda os pesquisadores verificaram que em hepatopâncreas e músculo a redução dos níveis lipídicos no outono, em comparação ao verão, é acompanhada por um progressivo aumento na concentração de glicogênio nestes tecidos. No músculo este substrato pode servir como uma importante fonte energética durante o inverno, uma vez que a concentração total de glicogênio é pequena, quando comparada a de lipídios.

Eichler (2001) verificou que no verão a captação de  $^{14}\text{C}$ -AIB pelas brânquias anteriores e posteriores foi maior do que no inverno, indicando que a captação de aminoácidos neutros sofre alteração de acordo com a estação do ano.

---

Schein e cols. (2005a) constataram uma modificação sazonal na atividade e expressão da PEPCK e na capacidade gliconeogênica no tecido muscular de *N. granulata*. No verão a capacidade de síntese de  $^{14}\text{C}$  glicose a partir de  $^{14}\text{C}$  alanina e a atividade e a expressão da PEPCK estão aumentadas em comparação ao inverno.

Chittó, (2006) mostrou que em brânquias de *N. granulata* ocorre variação sazonal na atividade gliconeogênica e na concentração de lipídios totais. Quando os animais eram submetidos a condições hiperosmóticas a conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose diminuiu no primeiro dia de estresse em brânquias anteriores e posteriores no inverno. Já no verão, a conversão de [ $^{14}\text{C}$ ]-glicerol em [ $^{14}\text{C}$ ]-glicose em brânquias posteriores diminuiu no terceiro dia de estresse hiperosmótico. Assim, durante o processo de aclimação ao estresse hiperosmótico, a comparação do padrão de resposta gliconeogênica branquial entre inverno e verão mostra marcantes diferenças sazonais (Chittó, 2006).

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, exigindo das espécies ajustes homeostáticos compensatórios (Bianchini e cols., 2008).

A capacidade osmorreguladora desempenha um importante papel na evolução e na conquista do habitat estuarino pelos organismos. Nos crustáceos eurialinos, a osmolaridade do fluido extracelular pode variar de maneira diversa em função da osmolaridade do meio ambiente. Entre os crustáceos decápodes, encontram-se desde animais estuarinos eurialinos capazes de tolerar grandes variações na salinidade do meio com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa – osmorreguladores – até espécies cuja pressão osmótica extracelular pode variar amplamente – osmoconformadores (Mantel e Farmer, 1983).

O caranguejo *N. granulata* é classificado como eurialino por suportar 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). Cervino e cols. (1996) demonstraram que caranguejos *N. granulata* adaptados durante 45 dias às salinidades de 7, 12, 20 ou 34 ‰, após submetidos a um experimento onde tinham liberdade de escolher uma entre estas quatro salinidades, optavam pela salinidade mais elevada, quando tinham sido previamente aclimatados à salinidade de 20 ou 34 ‰. Entretanto, aqueles animais aclimatados a baixas salinidades não apresentaram nenhuma preferência. Novo e cols. (2005) avaliaram a sazonalidade da osmorregulação em *N.grnulata* machos e fêmeas. Ambos os gêneros mostraram tolerar uma ampla variação de salinidade na água, tanto no inverno quanto no verão. Além disso, a despeito do aumento significativo da osmolalidade da água no verão não foi constatada mudança na osmolalidade da hemolinfa entre as duas estações.

Segundo Gilles (1987), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: (1) regulação anisosmótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolaridade da hemolinfa independente da osmolaridade do meio externo; (2) regulação isosmótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolaridade do fluido intracelular e do volume celular, com o objetivo de mantê-lo isosmótico em relação ao fluido extracelular.

A regulação isosmótica do fluido intracelular ocorre em duas fases: (1) compreende respostas imediatas de alteração do volume celular, como consequência de choques osmóticos, e envolve a alteração da plasticidade da membrana plasmática; (2) está relacionada com eventos de influxo e efluxo de efetores osmóticos, tanto orgânicos como inorgânicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ) (Gilles, 1987; Gilles e Delpire, 1997). Entre os efetores inorgânicos, o íon  $\text{K}^+$  é essencialmente importante durante os choques hipo-hiperosmótico, pois limita a alteração do volume celular em invertebrados eurialinos (Gilles, 1987; Gilles e Delpire, 1997). Contudo, os efetores orgânicos são considerados como principais responsáveis pelo reajuste do volume

---

celular durante alterações osmóticas do meio extracelular (Gilles e Delpire 1997; Gilles, 1997).

Os principais osmólitos orgânicos em eucariotos, que vivem em ambiente aquático estressante, estão restritos a uma pequena classe de moléculas com baixo peso molecular: polióis (glicerol, manitol e sacarose); aminoácidos livres e derivados de aminoácidos (taurina, glicina e glutamina); uréia e metilaminas (óxido de trimetilamina - TMAO, betaína e sarcosina) (Janh e cols., 2006).

Em invertebrados e em vertebrados de água doce, com exceção dos agnatas e dos celacantos, a osmolaridade extracelular é geralmente baixa: 280-359 mOsm/L. Os íons inorgânicos contribuem com aproximadamente 200-300 mOsm/L e os osmólitos orgânicos de baixo peso molecular com 50-100 mOsm/L. Em invertebrados marinhos ou em peixes primitivos a osmolaridade é aproximadamente três vezes mais alta. Em animais com osmolaridade extracelular de 1000 mOsm/L, aproximadamente 200-300 mOsm/L são de íons inorgânicos e o restante (700-800 mOsm/L) de diferentes osmólitos orgânicos, como os compostos nitrogenados e polióis. Entretanto, a concentração intracelular dos osmólitos inorgânicos permanece quase inalterada mesmo que ocorram grandes variações nas concentrações extracelulares (Gilles e Delpire 1997; Gilles, 1997).

Mudanças na concentração de osmólitos orgânicos no fluido extracelular influenciam diretamente as vias metabólicas intracelulares, pois alteram o fluxo de substratos (Gilles, 1977; Bock, 2005), a atividade e expressão de moléculas sinalizadoras (Gual e cols., 2003a;b; Wehner e cols., 2004; Lamitina e Strange, 2005) e a atividade de enzimas chave do metabolismo intermediário (Schein e cols, 2005a; Luquet e cols., 2005; Chittó, 2006). Possivelmente, essas mudanças permitem as adaptações fisiológicas necessárias à sobrevivência das células às alterações osmóticas do meio (Schliess e Häussinger, 2002).

Diversos estudos em diferentes espécies de crustáceos decápodes sugerem um controle endócrino sobre o mecanismo osmorregulatório. Eckhardt e cols. (1995)

---

verificaram a presença de um peptídeo na glândula do seio envolvido no controle neuroendócrino da osmoregulação em *Pachygrapsus marmoratus*. Pierrot e cols. (2000), trabalhando com o mesmo caranguejo eurialino aclimatado à água diluída, perfundiram as brânquias posteriores isoladas com o hormônio hiperglicêmico de crustáceos (CHH) obtido da glândula do seio. O CHH aumentou a diferença do potencial transepitelial e o influxo de Na<sup>+</sup> em 50% nestes órgãos, sugerindo a participação desse neuropeptídeo no controle da osmorregulação em crustáceos decápodes.

Serrano e cols. (2003) isolaram três diferentes isoformas de CHH (10SGeqiv: Z1, Z2 e Z3) de *Astacus leptodactylus* extraídas da glândula do seio, e as injetaram em animais apedunculados. Os autores verificaram que a isoforma D-Phe<sup>3</sup> (Z3) causou aumento da osmolalidade da hemolinfa e da concentração de Na<sup>+</sup>, enquanto as demais isoformas aumentaram somente a concentração de Na<sup>+</sup> hemolinfático. Esse trabalho mostrou, pela primeira vez, em crustáceo aclimatado à água doce, os efeitos das isoformas de CHH sobre a osmorregulação.

Em *N.granulata*, o estresse hiposmótico aumenta os valores de glicose circulante (Da Silva e Kucharski, 1992). Vinagre (1999) constatou que a ablação bilateral dos pedúnculos oculares não alterou a resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico em *N. granulata*. A autora sugere a possibilidade de envolvimento de outros hormônios ou de outras isoformas de CHH durante o estresse osmótico.

A ação da insulina sobre a osmorregulação tem sido investigada em células isoladas de mamíferos (adipócitos, hepatócitos) e os resultados indicam a relação do hormônio com o processo de ajuste osmótico (Gual e cols., 2003a; 2003b). Em crustáceos. Trapp (2005) mostrou o envolvimento da insulina e da via de sinalização ativada pela insulina (*insulin-like sistem*) na adaptação ao estresse osmótico. Nas brânquias do caranguejo *N.granulata* as características de ligação hormônio-receptor e a transdução do sinal insulínico foram modificados de maneira significativa de acordo com o tipo e o tempo do estresse ao qual os animais foram submetidos.



---

Desde sua descoberta por Banting e Best em 1922, a insulina tem sido alvo de inúmeras pesquisas, as quais marcam os avanços científicos nas áreas da endocrinologia comparada e molecular (Chan e Steiner, 2000). Os estudos comparativos realizados de agnatas a mamíferos, demonstraram que a insulina é uma molécula bastante antiga, e que o hormônio e suas funções sofreram poucas modificações ao longo da evolução (Kelley e cols., 2002; Richardson e cols., 1997).

A ampla distribuição filogenética das moléculas da família da insulina suscitou investigações a respeito da origem evolutiva deste hormônio. Chan e Steiner (2000) sugeriram que a insulina e os fatores de crescimento relacionados evoluíram a partir de um gene ancestral comum. Atualmente, acredita-se que esse gene apareceu na escala evolutiva a aproximadamente 600 milhões de anos, em representantes dos Archaemetazoa (precursores dos vertebrados e invertebrados) (Pertseva e Shpakov, 2002). Segundo Chan e Steiner (2000) a molécula *insulin-like* ancestral funcionou primariamente como um fator de crescimento mitogênico. Entretanto, o gene da insulina evoluiu e o hormônio passou a desempenhar o controle central da regulação do metabolismo intermediário em vertebrados (Chan e Steiner, 2000).

A insulina, os fatores de crescimento *insulin growth factors* (IGF-I e IGF-II), as relaxinas e os peptídeos semelhantes à insulina dos invertebrados são classificados como hormônios pertencentes a super-família da insulina. Essas substâncias apresentam semelhanças nas estruturas primária e terciária (Chan e Steiner, 2000).

A insulina de mamífero consiste de duas cadeias polipeptídicas (A e B), ligadas por bandas dissulfídricas. Essas cadeias são compostas por 51 aminoácidos, correspondendo 21 a cadeia A e 30 a cadeia B (Clayes e cols., 2002).

A produção e secreção da insulina foram inicialmente atribuídas às células  $\beta$ -pancreáticas, posteriormente descobriu-se que vários neurônios de diferentes regiões do Sistema Nervoso de vertebrados e células neurosecretoras cerebrais de invertebrados poderiam produzir insulina (Smit e cols., 1998; Gallardo e cols., 2003;

Wu e Brown, 2006). Em invertebrados, atualmente sabe-se que a insulina também é produzida no sistema gastro-entero-pancreático (Gallardo e cols., 2003, Wu e Brown, 2006).

Nas últimas décadas, substâncias semelhantes à insulina foram detectadas por métodos imunológicos, histoquímicos e biomoleculares em uma grande variedade de invertebrados, tais como insetos, crustáceos, moluscos, nematódeos, protozoários ciliados, fungos (*Aspergillus*, *Neurospora* e *Saccharomyces*), em procariotos como *Escherichia coli* e em *Amoeba proteus* e *Tetrahymena* (Ulrich, 1990; Souza e López, 2004). Contudo, poucas moléculas da superfamília da insulina foram caracterizadas em invertebrados. Atualmente são conhecidas: as bombixinas (4K-PTTHs) do bicho-da-seda *Bombyx mori* (Ishizaki e cols., 1983); os peptídeos relacionados à bombixina na mariposa *Samia cynthia ricini* (Kimura-Kawakami e cols., 1992); duas isoformas de peptídeos relacionados à insulina – LIRP-T1 e T2 do gafanhoto *Locusta migratoria* (Lagueux e cols., 1990; Kromer-Metzger e Lagueux, 1994); sete isoformas de peptídeos semelhantes à insulina (MIPS de 1-7) do molusco *Lymnaea stagnalis* (Smit e cols., 1998); peptídeo semelhante à insulina em *Aplysia californica* (Floyd e cols., 1999); cinco potenciais peptídeos com significante homologia às insulinas de camundongo e humana (DILPs 1-5) e dois (DILPs 6 e 7) com menores similaridades na mosca da fruta, *Drosophila melanogaster* (Vanden, 2001), dois peptídeos (*SI-ILPP1* e *SI-ILPP2*) relacionados a bombixina em *Spodoptera littoralis* (Van de Velde e cols., 2007), vários peptídeos relacionados à insulina no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Kawano e cols., 2000) e uma proteína de 6 kDa imunoreativa a insulina localizada no hepatopâncreas do crustáceo *Panulirus Argus* (Gallardo e cols., 2003).

A maioria das substâncias *insulin-like* clonadas em invertebrados foram isoladas em células do Sistema Nervoso. O alinhamento das seqüências peptídicas mostrou que as moléculas semelhantes à insulina de invertebrados apresentam pouca homologia entre si e com as insulinas e IGFs de vertebrados (Fig.1). Entretanto, todas



---

O evento inicial da ação pleotrópica da insulina é a ligação do hormônio a receptores localizados na membrana plasmática de células-alvo. Estes receptores reconhecem a insulina e com ela interagem com alto grau de seletividade e afinidade, transmitindo o sinal intracelular que resulta na resposta biológica do hormônio (Cheatham e Kahn, 1995; Saltiel e Kahn 2001). O receptor para insulina em todas as espécies de vertebrados estudadas, desde o primitivo peixe bruxa, é uma molécula heterotetrâmera, com duas subunidades  $\alpha$  extracelulares e duas subunidades  $\beta$  transmembrana (Chan e Steiner, 2000). Segundo Saltiel e Kahn (2001), essas subunidades funcionam como enzimas alostéricas, nas quais a subunidade  $\alpha$  inibe a atividade tirosina-quinase da subunidade  $\beta$ . A ligação da insulina à subunidade  $\alpha$  leva à liberação da atividade quinase na subunidade  $\beta$ , seguida por transfosforilação desta subunidade e mudanças conformacionais que iniciam uma complexa cascata de fosforilações em sítios de tirosina nesta subunidade. Essa cascata envolve 6 a 7 resíduos de tirosina, sendo três resíduos da subunidade  $\beta$  (Tyr1158, Tyr1162 e Tyr1163) os principais sítios de autofosforilação responsáveis pelo grau de ativação da tirosina quinase. Além da fosforilação da subunidade  $\beta$  do receptor, a transdução do sinal pela insulina ocorre através de eventos pós-receptor com a fosforilação de proteínas citoplasmáticas (*docking proteins*), como as proteínas da família do substrato do receptor para insulina (IRS 1 - 4), o fosfatidil-inositol-3-quinase (PI3-K) ou as proteínas da via das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAP quinase) (Cheatham e Kahn, 1995; Saltiel e Kahn 2001).

Em invertebrados, assim como em vertebrados, os receptores das substâncias semelhantes à insulina e os IGFs (fatores de crescimento) pertencem à família dos receptores com atividade tirosina quinase (RTKs) (Navarro e cols., 1995; Kucharski e cols., 1999). Os trabalhos da literatura demonstram que a transdução da informação desses hormônios sofreu poucas modificações ao longo da evolução. Os processos desencadeados pela interação hormônio-receptor têm se mostrado similares de

---

invertebrados a mamíferos, apesar da diferença na seqüência de aminoácidos desses receptores (Cheatham e Kanh, 1995; Navarro e cols., 1999; Wu e Brown, 2006).

Várias moléculas da família do receptor à insulina foram caracterizadas em diversas classes de invertebrados, tais como: insetos - *Drosophila melanogaster* (Wu e Brown, 2006), *Bombyx mori* (Fullbright e cols., 1997), *Aedes aegypti* (Graf e cols., 1997); em moluscos gastrópodes e bivalves - *Lymnaea stagnalis* (Roovers e cols., 1995), *Aplysia californica* (Jonas e cols., 1996), *Biomphalaria glabrata* (Lardans e cols., 2001), *Anodonta cygnea* (Leibush e Chistyakova, 2003), *Crassostrea gigas* (Gricourt e cols., 2003); no celenterado hidrozoário - *Hydra vulgaris* (Steele e cols., 1996); nos vermes - *Caenorhabditis elegans* (Kimura e cols., 1992) e *Echinococcus multilocularis* (Konrad e cols., 2003) e em poríferos (Skorokhod e cols., 1999).

Petruzzelli e cols. (1986) demonstraram que os receptores para mosca-da-fruta ou DIR (*Drosophila Insulin Receptor*) são estruturalmente semelhantes ao receptor de insulina humano, com 63% de homologia no domínio tirosina quinase. Yamaguchi e cols. (1995) construíram receptores quiméricos contendo o domínio extracelular do receptor de insulina humano, com as regiões transmembrana e intracelular de mosca-da-fruta. Esses receptores foram expressos em células de mamíferos e apresentaram a mesma habilidade de mediar a atividade de fosforilação nos resíduos de tirosina do substrato 1 do receptor à insulina (IRS-1), de estimular a proliferação celular e de ativar a MAP quinase quando comparados aos receptores de insulina humanos. Helbling e Graf (1998) clonaram o homólogo do receptor de insulina de mosquito - MIR (*mosquito insulin receptor*). Os autores descreveram que os receptores para insulina são expressos principalmente nos ovários, provavelmente com função relacionada à reprodução nesses insetos.

Roovers e cols. (1995) caracterizaram o receptor da *insulin-like* do molusco *Lymnaea stagnalis* – MIPR (*molluscan insulin-related peptide receptor*). Os autores

---

demonstraram que esse receptor apresentou homologia de 69% no domínio tirosina quinase com o receptor de insulina humano e, apesar de existirem várias isoformas de peptídeos *insulin-like* (MIPs de 1 – 7) em *L. stagnalis*, foi encontrado apenas um tipo de receptor.

Jonas e cols. (1996) isolaram o cDNA para a região tirosina quinase do receptor de insulina expresso no sistema nervoso do molusco *Aplysia californica*. Estudos de ligação e de imunocitoquímica mostraram que o receptor é muito abundante em um grupo de células neuronais (*bag cell neurons*) - responsáveis pelo surgimento do comportamento reprodutivo nesse molusco.

Trapp e cols. (2002) realizaram a clonagem parcial da região tirosina-quinase do receptor de insulina em brânquias posteriores de *N. granulata* (Fig.2). Os resultados do fragmento clonado (CGIRLTK- *Chasmagnathus granulata* Insulin Receptor Like Tyrosine Kinase, 118 pb, GenBank DQ104241) revelam uma similaridade de 84% com o receptor *insulin-like* de *Drosophila* e *Bombix*, já o grau de homologia com o receptor humano foi de 79%.

						Percent of homology
CIR		→	ELADGMAYLAKKGVVHRDLAARNCLLQRSLSITLKIGDFGM			
(MIR)	1156		ELADGMAYLADKKFVHRDLAARNCMVSEERTVKIGDFGM	1194		81%
(DIR)	845		ELADGMAYLAAKKFVHRDLAARNCMVADDLTVKIGDFGM	883		84%
(IRBm)	1204		ELADGMAYLSAKKFVHRDLAARNCMVAGDLTVKVGDFGM	1242		84%
(IRMm)	1098		ELADGMAYLAAKKFVHRDLAARNCMVSDFTVKIGDFGM	1136		79%
(IRC <sub>a</sub> )	541		ELADGMAYLSAKKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGM	579		81%
(IRR <sub>n</sub> )	1143		ELADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGM	1181		79%
(hIR)	1142		ELADGMAYLNAKKFVHRDLAARNCMVAHDFTVKIGDFGM	1180		79%
(hiRR)	1118		ELADGMAYLNANKFVHRDLAARNCMVAEDFTVKIGDFGM	1156		76%
					←	
(CIR)	insulin-like receptor [ <i>Chasmagnathus granulata</i> ]					
(MIR)	molluscan insulin-related peptide(s)receptor [ <i>Lymnaea stagnalis</i> ]X8499					
(DIR)	insulin-like receptor [ <i>Drosophila melanogaster</i> ] A56081					
(IRBm)	insulin receptor-like protein [ <i>Bombyx mori</i> ] AF025542					
(IRMm)	insulin receptor-related receptor [ <i>Mus musculus</i> ] NP_034698.1					
(IRC <sub>a</sub> )	insulin receptor 1 [ <i>Carassius auratus</i> ] AF321225					
(IRR <sub>n</sub> )	insulin receptor [ <i>Rattus norvegicus</i> ] NP_058767.1					
(hIR)	human insulin receptor [ <i>Homo sapiens</i> ] NP_000199.1					
(hiRR)	human insulin-like growth factor 1 receptor [ <i>Homo sapiens</i> ] X0443.4					

**Figura 2:** Comparação da seqüência de aminoácidos do CIR (*insulin-like* receptor *Chasmagnathus granulata*), com outros membros da superfamília do IR (insulin receptor) (Trapp e cols., 2002).

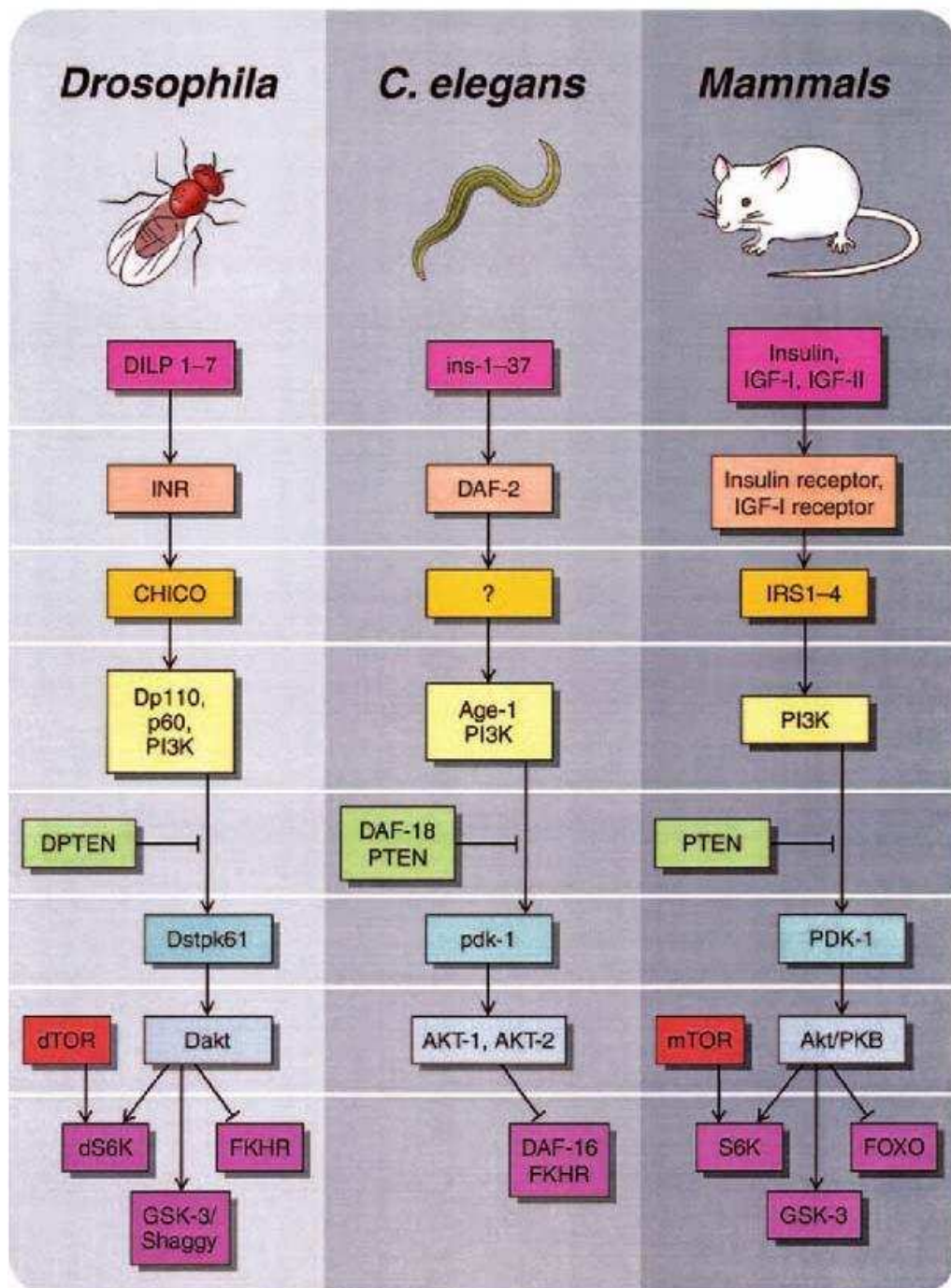
Esses receptores semelhantes à insulina de invertebrados apresentam homologia estrutural e funcional entre si e com os receptores de vertebrados. Entretanto, contrastando com as várias isoformas de moléculas *insulin-like* encontradas em invertebrados, exemplificadas pelos MIPs (1-7) e DILPs (1-7), a maioria dos trabalhos apontam à presença de um único receptor para diferentes isoformas do hormônio (Claeys e cols., 2002; Gricourt e cols., 2003). Acredita-se que as várias moléculas semelhantes à insulina de invertebrados ligam-se em diferentes sítios de um mesmo receptor ou com diferentes afinidades para desencadear as respostas hormonais. Assim, os dados existentes até o momento com relação às substâncias *insulin-like* e seus receptores em invertebrados sugerem que os

---

receptores são evolutivamente mais conservados do que o hormônio (Mugeo e cols., 1979; Claeys e cols., 2002; Wu e Brown, 2006).

A sinalização pós-receptor em invertebrados é ainda pouco conhecida quando comparada com os dados em mamíferos, sendo que substâncias intracelulares envolvidas nos eventos de transdução do sinal da insulina foram identificadas apenas em *D. melanogaster* e *C. elegans* (Fig.3). Em drosófila, foram caracterizadas várias substâncias homólogas às moléculas encontradas em mamíferos: substâncias homólogas ao IRS-I (CHICO), ao Grb2 (Drk), ao MEK (DSORT), ao ERK (ERK-A), a PI3K (Dp110). Contudo, os eventos de transdução do sinal podem envolver a ativação do CHICO ou a ligação de substratos, como o PI3K, no próprio receptor em locais específicos (“docking sites”). No nematóide *C. elegans* também foram identificadas moléculas semelhantes ao PI3K (AGE-1) a ao AKT-1 e ao AKT-2 (PKB) e, assim como em drosófila, os eventos sinalizadores podem se desenvolver sem o uso de moléculas IRS. Nesse nematóide, o caminho sinalizador da insulina, envolve a ativação de AGE-1 e regula o metabolismo, o desenvolvimento e a longevidade (Claeys e cols., 2002; Porte Jr. e cols., 2005; Wu e Brown, 2006).



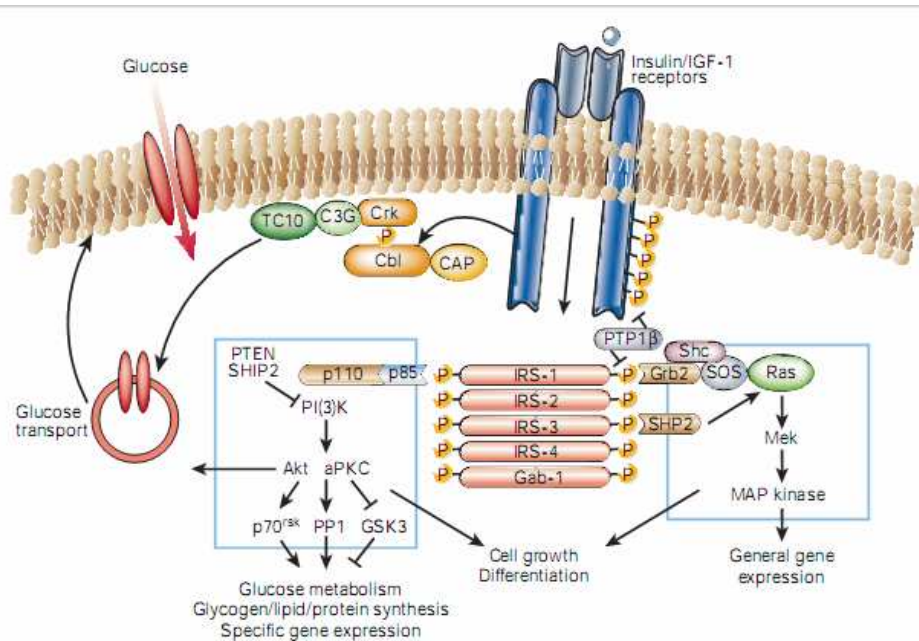


**Figura 3.** Substâncias intracelulares envolvidas com a transdução do sinal da insulina – comparação entre *D. melanogaster*, *C. elegans* e mamíferos (Porte Jr e cols., 2005)

---

Em mamíferos, a ligação da insulina aos seus receptores de membrana desencadeia cascatas de eventos intracelulares, com a ativação de diversas proteínas e substratos citoplasmáticos que culminam nas respostas biológicas ao hormônio. Nesses animais as ações das substâncias da família da insulina estão relacionadas com a regulação do metabolismo, do crescimento, da diferenciação celular; da reprodução, da longevidade e do controle do volume celular (Saltiel e Kahn, 2001; Porte Jr. e cols., 2005; Lamitina e Cols., 2006).

A insulina e os fatores de crescimento relacionados à insulina (IGF- I e IGF-II) têm um importante papel na regulação do metabolismo e do crescimento. A insulina atua em processos intracelulares, incluindo: a regulação do transporte de íons, de aminoácidos e de glicose, a transcrição de genes e a modulação da transcrição de mRNAs específicos, além da síntese de DNA. Alguns dos seus principais efeitos biológicos são o estímulo ao transporte de glicose (via Glut-4), a captação de aminoácidos, a síntese de lipídios, de glicogênio e de proteínas (Taha e Klip, 1999; Navarro e cols., 1999; Kelley e cols., 2002). Desta forma, a insulina é considerada o principal hormônio envolvido nos processos de biossíntese nos vertebrados (White e Kahn, 1994; Navarro e cols., 1999; Saltiel e Kahn, 2001). Já o IGF- I tem um importante papel estimulatório sobre a diferenciação e o crescimento dos tecidos. Ambos hormônios ligam-se especificamente aos seus receptores de superfície celular e as interações hormônio-receptor são semelhantes em mamíferos, pássaros, anfíbios e peixes ósseos (Navarro e cols., 1999).



**Figura 4:** Efeito biológico da insulina/IGF-1 sobre o metabolismo energético, crescimento, diferenciação celular e expressão de genes em mamíferos. → estímulo -| repressão (Saltiel e Kanh, 2001).

Quanto à ação da insulina ou do IGF-I em vertebrados não mamíferos, como os peixes, as funções exatas ainda estão sob investigação. A insulina é o hormônio mais relacionado à regulação do metabolismo da glicose, mas ela pode ter um papel secundário no crescimento e diferenciação celular em peixes, processo que, em mamíferos, é predominantemente regulado pelo IGF-I (Planas e cols., 2000).

Plisetskaya e Duan (1994) ao injetar estreptozotocina (conhecida por danificar as células  $\beta$ -pancreáticas em mamíferos) em salmão verificaram uma diminuição na produção de insulina. Esta redução, por sua vez, causou diminuição na expressão do IGF-I no fígado e, conseqüentemente, prejuízos ao crescimento normal desse animal. Assim demonstrando que a insulina pode afetar o crescimento em peixes.

---

Recentemente, foi mostrado por Méndez e cols. (2005) que a insulina e o IGF-I, provavelmente, via proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), bloqueiam a ação do hormônio luteinizante (LH) em ovários de truta, indicando que esses hormônios podem exercer funções importantes na regulação da reprodução em peixes.

Em invertebrados, as ações da insulina e dos IGFs se confundem ainda mais, sendo que ambos participam nos processos de diferenciação e de crescimento celular em praticamente todos os grupos estudados (Chan e Steiner, 2000). Na recente revisão sobre o papel dos peptídeos relacionados a insulina em invertebrados, Wu e Brown (2006) descrevem que as substâncias *insulin-like* têm ações distintas, de acordo com a espécie estudada, sobre: o metabolismo, o crescimento, a diferenciação celular, a reprodução, a longevidade e a osmorregulação.

Na mosca-da-fruta *Drosófila melanogaster* a ablação das células produtoras de insulina (insulin-producing cells- IPCs) na fase larval resultou em um aumento de 38% na concentração de carboidratos na hemolinfa (Rulifson e cols., 2002). Além disso, a insulina aumenta a oxidação e a produção de lactato e estimula o crescimento celular (Rulifson e cols., 2002).

Em *Bombix mori*, na fase larval, a administração de bombixina-II (*insulin-like peptide*) reduziu as concentrações de trealose e de glicogênio e causou estímulo na atividade das enzimas trealase e glicogênio fosforilase (Wu e Brown, 2006). Já a administração de *insulin-like peptides* em *B.mori* na fase adulta não afeta as concentrações de trealose na hemolinfa. Em conjunto, estes resultados indicam que os peptídeos relacionados à insulina estimulam a utilização de glicose, porém, não promovem o seu armazenamento em *B.mori* na fase larval. Ao mesmo tempo sugerem que os peptídeos *insulin-like* podem atuar de maneira distinta de acordo com o ciclo de vida nesta espécie de *Lepdoptera* (Wu e Brown, 2006).

---

Na lesma do mar *Aplysia californica*, a exposição à insulina por 15 a 30 minutos aumentou a amplitude e diminuiu a duração do potencial de ação de um grupo de células neuronais isoladas (*bag cell neurons*). Estes resultados sugerem que a substância similar à insulina de *A. californica* atue como um neuromodulador ou neurotransmissor, regulando a excitabilidade desses neurônios os quais estão envolvidos com o comportamento reprodutivo desse molusco (Jonas e cols., 1996).

Vários trabalhos demonstram o envolvimento das substâncias da família da insulina/IGF no crescimento e desenvolvimento em invertebrados. Na ostra do Pacífico *Crassostrea gigas*, o IGF-I humano estimulou a síntese de proteína em células do manto, sendo que a estimulação hormonal foi maior na primavera (período de maior crescimento desses animais) do que em outras estações. Receptores *insulin-like* foram caracterizados nessas células e estão relacionados com o crescimento da concha e dos tecidos moles. Nesses animais, como em mamíferos, o IGF-I foi mais eficiente do que a insulina em promover o crescimento corporal (Gricourt e cols., 2003).

Sanders (1983a) identificou e isolou por cromatografia uma molécula semelhante à insulina no hepatopâncreas da lagosta *Homarus americanus*. Essa molécula foi capaz de estimular a fosforilação de receptores à insulina de placenta humana. Gallardo e cols. (2003) isolaram e caracterizaram uma proteína *insulin-like*, também no hepatopâncreas da lagosta *Panulirus argus*. Essa proteína interagiu com anticorpos anti-insulina de mamíferos e estimulou a oxidação da glicose a CO<sub>2</sub> e a lipogênese em adipócitos isolados de rato. Gutiérrez e cols. (2007) avaliaram os efeitos da administração de insulina bovina e do IGF-I humano no camarão *Penaeus vannamei*. Nesse trabalho a administração de insulina aumentou a concentração de glicogênio nas brânquias e no hepatopâncreas e não alterou os níveis de glicose na hemolinfa, assim os pesquisadores sugerem à presença de substância similar a insulina neste crustáceo. Recentemente, Manor e cols. (2007) realizaram a clonagem

e verificaram a expressão de uma molécula *insulin-like* na glândula androgênica do lagostin *Cherax quadricarinatus*. A molécula de insulina clonada CqIAD (*Cherax quadricarinatus* insulin Androgenic Gland) mostrou um alinhamento nos resíduos de cisteínas das cadeias A e B com outras proteína da família da insulina (bombixina-I, DILP, IGF-I, insulina). Contudo, ainda não são conhecidas às ações fisiológicas dessa molécula, acredita-se que estejam relacionadas com os processos de regulação e de diferenciação sexual em crustáceos.

Quanto aos receptores *insulin-like*, Chuang e Wang (1993) isolaram, do hepatopâncreas do camarão *Penaeus japonicus*, uma proteína fosfotirosil-fosfatase que desfosforilou os receptores à *insulin-like* de camarão e humanos. Posteriormente, os autores caracterizaram, imunologicamente, a subunidade  $\beta$  de 79 kDa do receptor de insulina do músculo desse camarão. A insulina de mamífero estimulou a autofosforilação deste receptor em resíduos de tirosina e a proteína fosfotirosil-fosfatase de placenta humana causou sua desfosforilação (Chuang e Wang, 1994).

Pela técnica de radioreceptores, Kucharski e cols. (1997) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, nas brânquias do caranguejo *Neohelice granulata*, a presença de sítios de ligação à insulina com propriedades semelhantes àquelas dos receptores de vertebrados. Em 1999, Kucharski e cols. avaliaram a atividade tirosina quinase em receptores isolados de brânquias, na presença e na ausência de insulina bovina. Os autores constataram que a insulina aumentou (1,3 vezes) a capacidade de autofosforilação do receptor (subunidade de 95 kDa), detectada por autorradiografia e pela fosforilação do substrato exógeno poly (Glu: Tyr 4:1). A genisteína que é um potente inibidor da atividade da tirosina quinase, bloqueou a estimulação da insulina.

Com relação aos efeitos biológicos da insulina/IGF em crustáceos, os trabalhos de Sanders (1983 a, b, c) demonstram que a insulina bovina aumentou, no músculo da lagosta *Homarus americanus*, a incorporação do  $^{14}\text{C}$  da glicose em glicogênio. Contudo, a insulina endógena encontrada na hemolinfa desse crustáceo não

---

apresentou efeito glicostático. Após, outros autores demonstraram que a insulina de mamífero aumentou a captação de glicose nas brânquias posteriores do caranguejo *Carcinus maenas* (Welcomme e Devos, 1994) e no músculo da craca *Balanus balanus* (Hager e Bittar, 1985). Em *Cherax quadricarinatus*, a insulina humana e o IGF-I aumentaram a concentração de glicose livre no hepatopâncreas e no músculo. Além disso, o IGF-I estimulou a incorporação de  $^{14}\text{C}$  da glicose em glicogênio no músculo e o de  $^{14}\text{C}$  da leucina em proteínas no hepatopâncreas e no músculo, sugerindo um duplo efeito para esse hormônio em crustáceos (Richardson e cols., 1997).

Trapp (2000) demonstrou que a composição da dieta e o estado alimentar influenciam a capacidade de fosforilação do receptor *insulin-like* do tecido branquial do caranguejo *Neohelice granulata*. A administração de dieta rica em carboidratos (RC) aumentou a fosforilação basal do receptor insulínico, detectada pela fosforilação do substrato exógeno poly (Glu: Tyr) 4:1, em relação à dieta rica em proteína (RP). Além disso, foi evidenciando um aumento na fosforilação do receptor após 30 dias de jejum em animais previamente alimentados com dieta RP. Os dados sugerem que a insulina participa no processo de regulação metabólica do tecido branquial de crustáceo quando submetido a diferentes dietas e após ao jejum.

Em *N. granulata*, Kucharski e cols. (2002) verificaram que a insulina bovina aumentou a incorporação do  $^{14}\text{C}$ -glicose em glicogênio e a captação de glicose em brânquias posteriores, contudo o efeito não foi observado em brânquias anteriores. A dose de insulina de mamífero necessária para estimular tanto a glicogênese como a captação de glicose nas brânquias posteriores foi maior no verão ( $40\mu\text{U/ml}$ ) do que no inverno ( $20\mu\text{U/ml}$ ), indicando uma variação sazonal na resposta metabólica ao hormônio em *N.granulata*.

Martins (2003) demonstrou que o tratamento do caranguejo *N. granulata* com insulina porcina por 8 dias não causou variação nos níveis de glicose da hemolinfa, o

---

que sugere que este hormônio não tem efeito glicostático em crustáceos. Contudo, a insulina de mamífero aumentou a captação de aminoácidos (ácido amino butírico – AIB) nas brânquias posteriores e no hepatopâncreas e a atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase nas brânquias posteriores.

Em crustáceos estuarinos, as mudanças dos fatores bióticos e abióticos do ambiente externo podem modular a atividade e a expressão de enzimas chave de vias metabólicas importantes para a manutenção das espécies (Kucharski e Da Silva, 1991a; Oliveira e Da Silva, 1997; Schein e cols., 2004; Schein e cols., 2005a; Marquese, 2004). As regiões de pântanos e marismas impõem à sua biota um elevado grau de estresse celular relacionado com a magnitude e o tempo de exposição a mudanças extremas de fatores ambientais (Novo e cols., 2005; Jun Xu e Wu, 2006). Dentre os fatores destaca-se a salinidade uma vez que suas flutuações diárias e sazonais exigem das espécies estuarinas e intertidais mudanças constantes nos mecanismos de regulação do volume celular (Gilles e Delpire, 1997; Luquet e cols., 2002; Novo e cols., 2005). A ativação desses mecanismos regulatórios determina modificações dos sistemas de transporte celular de osmólitos orgânicos e inorgânicos, assim como, do metabolismo intracelular (Gilles e Delpire, 1997; Towle e Weihrauch, 2001; Schein e cols., 2005b)

Em crustáceos eurialinos, assim como em outros animais, o suprimento constante de glicose da hemolinfa para os tecidos é crucial para o funcionamento celular, em especial nos momentos de elevada demanda metabólica a exemplo da regulação osmótica (Radford e cols., 2005; Lorenzon e cols., 2007). Em diversas espécies animais, o transporte de glicose para o compartimento intracelular ocorre via co-transporte de sódio-SGLT (*SGLT-sódio glucose like transporter*) ou via difusão facilitada-GLUT (*GLUT-glucose transporter*) (Joost e Thorens, 2001; Verri e cols., 2001; Kaloyianni e Doukakis, 2003; Seki e cols., 2003; Villela e cols., 2003; Zhao e Keating, 2007). Os transportadores de glicose sódio dependente, do tipo SGLT-1, foram descritos e alguns clonados em todos os grupos de vertebrados: peixes,



---

anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos (Kipp e cols., 1997; Nagata e cols., 1999; Pajor e cols.; 1992; Garriga e cols., 1999; Hediger e cols., 1987; Pascual e cols., 2006). Em invertebrados, esse sistema de transporte de glicose foi detectado em moluscos, ecnodérmos e crustáceos (Pascual e cols., 2006). Já o transporte de glicose via difusão facilitada (GLUT) foi verificada em artrópodes, peixes, aves e mamíferos (Pascual e cols., 2006).

Dentre as proteínas que realizam o transporte facilitado de glicose está o GLUT-4. Atualmente sabe-se que a dinâmica de transporte dessa proteína pode ser modulada por fatores hormonais e não hormonais. Em vertebrados, a insulina aumenta o transporte de glicose em células musculares e adiposas pela translocação de GLUT-4 do meio intracelular para a membrana plasmática e aumenta a expressão destes transportadores (Saltiel e Kahn 2001). Além disso, pesquisas recentes mostram que o transporte de glicose via GLUT-4 também é estimulado por fatores não hormonais, como a contração muscular e o estresse osmótico (Gual e cols., 2003). Em invertebrados, são conhecidos poucos estudos sobre o efeito de fatores hormonais e não hormonais sobre o transporte celular de glicose via difusão facilitada. Baker e Carruthers (1980), utilizando músculo de crustáceo como modelo experimental, demonstraram que a insulina de mamíferos aumentou a captação de glicose, a adição de floretina ao meio de incubação inibiu o transporte desta hexose. A insulina bovina também estimulou o transporte de hexoses no músculo de *Balanus nubilis* e no tecido branquial do caranguejo *Carcinus maenas* (Hager e Bittar, 1985; Welcomme e Devos, 1994). Nas brânquias do caranguejo *N. granulata*, Kucharski e cols. (2002) mostraram que o transporte de glicose é estimulado pela insulina bovina.

As variações ciclo-anuais dos níveis de salinidade e de O<sub>2</sub> ambiental a que estão sujeitos os crustáceos regulam o ciclo de síntese/ mobilização de glicogênio e podem modificar a concentração de aminoácidos tissulares nestas espécies (Vinagre e Da Silva, 1992; Vinagre e Da Silva, 2002; McNamara e cols., 2004;. Schein e cols., 2005b; Augusto e cols., 2007). A concentração intracelular de aminoácidos livres é

---

alterada durante a regulação do volume celular, após a exposição ao estresse osmótico. Dessa maneira os aminoácidos intracelulares são frequentemente investigados e podem indicar a capacidade de adaptação das espécies a salinidade ambiente (Wehner e cols., 2004; Kube e cols., 2007). Em crustáceos, a concentração de aminoácidos tissulares é dez vezes maior do que em mamíferos; sendo os aminoácidos arginina, alanina, glicina, prolina, ácido glutâmico e a taurina os mais importantes (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997; Wehner e cols., 2004). A contribuição relativa de cada aminoácido aos ajustes osmóticos pode variar entre as espécies e entre os diversos tecidos de uma mesma espécie (Gilles 1997; Gilles e Delpire, 1997). Vários estudos mostram um aumento na concentração de aminoácidos nos tecidos de invertebrados quando submetidos a estresse hiperosmótico (Dragolovich e Pierce, 1992; Okuma e Abe, 1994; Bishop e cols., 1994). Contudo, durante o choque hiperosmótico, os níveis de proteínas da hemolinfa e aminoácidos livres diminuem indicando que as proteínas hemolinfáticas e tissulares possam ser fontes de aminoácidos livres durante esse processo (Tan e Choong, 1981; Freire e cols., 1995).

Diferentemente da glicose, o transporte de aminoácidos é realizado por diversos sistemas. Esses sistemas apresentam uma ampla heterogeneidade funcional e de distribuição na membrana plasmática e nos tecidos (Guidotti e Gazzola, 1992). Em mamíferos, o transporte de aminoácidos neutros ocorre via sistema A, ASC, L e N. O sistema A é adaptativo, dependente de sódio, sensível a alterações no potencial eletrogênico e transporta aminoácidos neutros com cadeias laterais de tamanhos diferentes (glicina, L- alanina, L- metionina, L- glutamina e L- prolina), bem como, metilaminas (sarcosina, betaína e o análogo não metabolizável MeAIB) (Guidotti e Gazzola, 1992; Schein e cols., 2005a, Jahn e cols., 2006). O transporte de aminoácidos via sistema A é regulado pela osmolalidade extracelular e está envolvido nas respostas iniciais às alterações osmóticas (Wehner e cols., 2004). Em eritrócitos e hepatócitos isolados de truta (*Salmo trutta*), Gallardo e cols. (1997) demonstraram variação sazonal na capacidade de captação de amino ácidos neutros. Já nas

---

brânquias de *N.granulata*, Eichler (2001) identificou que o transporte de aminoácidos ocorre via sistemas A (dependente de sódio) e L (independente de sódio). Ainda nesse trabalho, a captação de AIB (ácido amino-isobutírico) foi avaliada entre as estações de inverno e verão, em animais aclimatados ao laboratório, e os resultados obtidos sugerem que nas brânquias posteriores de *N.granulata* o sistema A pode encontrar-se mais ativo no verão.

No seu habitat o *N. granulata* permanece longos períodos fora da água, sendo considerado uma espécie semi-terrestre (Mañe-gazon e cols.,1974). Uma das estratégias para a conquista do meio terrestre foi a interiorização das brânquias, determinada pelo prolongamento da carapaça. Desta forma, ao sair do ambiente aquático, o animal mantém os tecidos umedecidos através da retenção de água na cavidade branquial. O *N.granulata* possui cinco pares de brânquias anteriores e três pares de brânquias posteriores, dispostas nos mesmos segmentos torácicos (Mañe-gazon e cols., 1974; Bond-Buckup e cols., 1991).

Está descrito na literatura que o tecido branquial de crustáceos apresenta uma diferenciação funcional e estrutural (Luquet e cols., 2002). 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 (Luquet e cols., 2002).

Em crustáceos o sistema muscular permite a interação dos organismos com o meio ambiente e desempenha importantes funções metabólicas. Morfologicamente, os músculos de crustáceos são similares aos estriados de vertebrados, porém, existem diferenças entre espécies e na mesma espécie dependendo da ação realizada (Medler e cols., 2005; Gimenez e cols., 2007). Quanto às funções fisiológicas, o tecido muscular contribui para homeostase através da síntese e mobilização de proteínas, do fornecimento de substratos energéticos (lipídios e glicose) para os demais tecidos, da

---

metabolização do lactato hemolinfático (McNamara, 2004; Augusto e cols., 2007; Maciel e cols., 2008). A regulação do reservatório de aminoácidos é particularmente importante para espécies eurialinas. Schein e cols. (2003) mostraram que o músculo mandibular é um tecido ativamente envolvido no processo de ajuste osmótico em condições de estresse salino em *N. granulata*.

Em *N. granulata*, as brânquias e o músculo são tecidos envolvidos no ajuste osmótico e, portanto, fisiologicamente muito requisitados sazonalmente. O músculo é banhado, principalmente, pela hemolinfa, já as brânquias estão em contato direto com o meio externo e precisam dispor de mecanismos que possibilitem rápidos ajustes às variações ambientais de salinidade, de pH e de temperatura.

Já foi demonstrado que fatores neuro-endócrinos influenciam a regulação osmótica em crustáceos. Moles (2006) descreve o envolvimento do hormônio hiperglicemiante de crustáceos com o transporte de íons e o equilíbrio osmótico. Em crustáceos é bem documentado que o CHH regula o metabolismo de carboidratos com efeito estimulatório sobre a enzima glicogênio fosforilase e inibitório sobre a glicogênio sintase muscular e hepatopancreática (Moles, 2006). Estes aspectos fisiológicos do CHH motivam a identificação de hormônios contraregulatórios em crustáceos, a exemplo da *insulin-like*. Além disso, trabalhos prévios demonstram que a insulina de mamífero estimula a glicogênese e o transporte de glicose em brânquias de crustáceos e mostram uma variação sazonal na ação do hormônio (Kucharski e cols., 2002; Gutiérrez e cols., 2007).

O efeito da sazonalidade sobre os processos bioquímicos e fisiológicos ainda é pouco conhecido, embora seja registrado em mais de 200 espécies de invertebrados. Em humanos alguns trabalhos indicam uma alteração na sensibilidade à insulina de acordo com a época do ano (Bunout e cols., 2003). Também em vertebrados não mamíferos foi constatada uma variação anual na ligação insulina-receptor. Scapin e Incerpi, (1992) mostraram que em *Rana esculenta* a variação anual na ligação insulina-receptor reflete a modulação do número de receptores ao hormônio e pode

---

estar associada às mudanças de temperatura e de pH. Contudo, a ação da insulina sobre a osmorregulação, a variação do sinal insulínico em função de alterações sazonais de aspectos ambientais, bem como, a magnitude dessas relações necessita ser mais bem investigada.

Em crustáceos diversas pesquisas indicam alterações sazonais, tecido-específicas, do metabolismo de carboidratos e de lipídios (Bromberg 1992, Kucharski and Da Silva 1991b; Novo e cols., 2005; Castiglioni e cols., 2006; Vinagre e cols., 2007; Oliveira e cols., 2007; Buckup e cols., 2008). Entretanto, até o momento, são desconhecidos trabalhos que avaliem aspectos bioquímicos e fisiológicos da ação da insulina e suas possíveis relações com as mudanças sazonais do meio ambiente. Igualmente são raros os estudos que avaliem o efeito da sazonalidade sobre a captação de hexoses e de aminoácidos, uma vez que os estudos que avaliam o efeito da sazonalidade sobre diferentes vias metabólicas nesta espécie têm sido conduzidos em condições controladas de temperatura, de salinidade, de pressão parcial de oxigênio e de disponibilidade e composição do alimento.

O *N. granulata* é um adequado modelo biológico para o estudo da sazonalidade, pois sofre amplas variações bióticas e abióticas em seu ambiente natural. Além disso, é um caranguejo escavador que habita, em ampla extensão, a área intertidal em regiões estuarinas e desempenha uma importante engenharia de ecossistema, com efeitos diretos na infauna, na epifauna, na qualidade da água e do solo (Menone e cols., 2004). Estudos sobre a ecofisiologia desses animais contribuem para a compreensão das estratégias fisiológicas utilizadas por esses crustáceos que permitem a vida em um ambiente tão estressante como o estuário.

---

A partir do exposto a hipótese desse trabalho é: As mudanças sazonais de fatores ambientais podem afetar a expressão do gene GCIRLTK, as características de ligação e de transdução do sinal insulínico, o transporte de nutrientes e osmólitos em brânquias e músculo de *N. granulata*?

# OBJETIVOS

## 1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da sazonalidade sobre a expressão gênica, as características de ligação e afinidade e a transdução do sinal insulínico, bem como, a captação de aminoácidos neutros e de glicose em brânquias posteriores, anteriores e músculo mandibular de *N.granulata* em seu ambiente natural

## 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Medir, a cada estação, no ar, na água do estuário e na hemolinfa dos caranguejos os seguintes parâmetros: temperatura (ar e água), pH (água e hemolinfa) e osmolalidade (água e hemolinfa);
- Investigar a sazonalidade da expressão da região tirosina quinase do gene CGIRLTK em brânquias anteriores e posteriores e no músculo mandibular.
- Conhecer as variações sazonais da porcentagem de ligação específica da  $^{125}\text{I}$ -insulina em brânquias anteriores e posteriores e no músculo mandibular.
- Avaliar a cada estação as características da competição da  $^{125}\text{I}$ -insulina e a insulina não marcada em brânquias anteriores e posteriores e no músculo mandibular.



- 
- Verificar a sazonalidade da afinidade e a concentração de receptores à insulina em brânquias posteriores, anteriores e no músculo.
  - Avaliar a fosforilação do substrato sintético poly (Glu; Tyr) 4:1 em preparações de membranas plasmáticas de brânquias posteriores, anteriores e de músculo.
  - Investigar a sazonalidade da captação de 2- [<sup>14</sup>C] deoxi-D-glicose e 3-O- [<sup>14</sup>C] metil-D-glicose em brânquias anteriores, posteriores e no músculo.
  - Investigar a sazonalidade da captação de 1-[<sup>14</sup>C] MeAIB- ácido metil aminoisobutirico em brânquias anteriores, posteriores e no músculo.

# **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1 Materiais

Os produtos utilizados tinham as seguintes procedências: Tris (hidroximetilaminometano) da Aldrich; Fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), ortovanadato de sódio, trifosfato de adenosina (ATP), o polímero sintético poly (Glu; Tyr) 4:1, prolactina ovina, 2,5-Dipheniloxazola (PPO), 1,4-bis [2-(5-feniloxazonil-benzeno)] (POPOP) e Hepes, da Sigma; Triton X-100, ácido acético, ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA), sulfonil dodecil de sódio (SDS), metanol, cloreto de sódio, sacarose, cloreto de manganês ( $MnCl_2$ ), cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), cloreto de cálcio ( $CaCl_2$ ), bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) e cloreto de potássio (KCl) da Merck; Ácido tricloroacético (TCA), ácido ortofosfórico e tolueno, da Nuclear; Sulfato de sódio ( $Na_2SO_4$ ) da Reagen; Brometo de sódio (NaBr) da Vetec; Albumina de soro bovino (BSA) da Gibco; Genisteína, *coomassie brilliant blue*, da Acros; Insulina regular humana da Biohulin e a insulina bovina foi gentilmente cedida pela Companhia Biobrás (Brasil). Papéis de fosfocelulose da Gibco BRL e papéis filtro (Whatman GF/B 2,4 cm).

Os materiais radioativos, [ $\gamma^{32}P$ ] ATP (300mCi/nmol),  $^{125}I$ -insulina (25,000 cpm/min de  $Tyr^{A14-125}I$ -monoiodoinsulina humana, 2,000 Ci/mmol de atividade específica), 1- $[^{14}C]$  2-deoxi-D-glicose (39mCi / mmol-Amersham), 3-O- $[^{14}C]$  metil-D-glicose (53mCi / mmol, Amersham) e 1- $[^{14}C]$  MeAIB- ácido metil-aminoisobutírico (250 mCi / mmol, Du Pont).

Os equipamentos utilizados foram: osmômetro de pressão a vapor Wescor; 5520, homonegeizador tipo Potter-Elvehjem com pistilo de teflon, homogeneizador Omni Mixer e o homogeneizador tipo Dounce (Konte Glass Co USA). As centrífugas foram a Sorvall (RC-5B, rotor SS 34, Du Pont) e centrífuga refrigerada para tubos tipo eppendorf (Sanyo). Foi utilizado banho metabólico Dubnoff precision e contador de cintilação beta ou contador gama da LKB.

Para os experimentos de biologia molecular, foram utilizados: termociclador (PTC – MJ Research), GeneQuant (Pharmacia Biotech), reagentes SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen), Supermix (Invitrogen), Trizol (Gibco), reagentes e solução Q para PCR (Qiagen®).

Os softwares utilizados foram RADILIG (Kell package for Windows™ - Biosoft, Cambridge, U.K.), Origin-Pro 7.5 e Sigma Stat 2.0.

## **2 Coleta de Animais e Medidas de Fatores Abióticos do Ambiente Estuarino**

Neste estudo utilizamos caranguejos machos da espécie *Neohelice granulata* (Dana, 1851 – Crustácea-Decapoda- Brachyura), no estágio C de intermuda (Drach e Tchernigovzeff, 1967). Os animais foram coletados na população natural da margem leste da Lagoa de Tramandaí (29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste), no município de Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil (Fig. 5). O período de coleta foi de dois anos (outono 2004/verão 2007) sendo os animais capturados manualmente no sedimento areno-lodoso, dentro da água ou nas tocas. No momento da coleta também foram medidas as temperaturas ambiente e da água da margem da lagoa (até 0,5m de profundidade) e coletadas amostras de água para medida do pH e da osmolalidade.



**Figura 5:** Estuário de Tramandaí- RS, local de coleta do *N.grnulata* (acima à direita).

### 3 Procedimentos Experimentais

#### 3.1 Medida da Osmolalidade e pH da Hemolinfa

No momento da coleta os quatro últimos animais capturados eram reservados para retirada da hemolinfa. Dessa forma os animais foram coletados e imediatamente a hemolinfa retirada da articulação entre o 4º e 5º pereiópodo e acondicionada no gelo em tubo de 2mL. Na seqüência, a hemolinfa foi utilizada para a medida de pH (pHmetro portátil Phtek Ph53B) e determinação da osmolalidade em osmômetro de pressão de vapor (Wescor 5520).

### 3.2 Preparo dos tecidos para obtenção de membranas plasmáticas

Imediatamente após a coleta, ainda no estuário, os animais foram crioanestesiados por imersão em recipiente com gelo escama durante 15 minutos. Na seqüência, as brânquias anteriores e posteriores e o músculo mandibular (Fig. 6) foram removidos e, sobre placa de Petri gelada, lavados com SFC (solução fisiológica para crustáceo), embalados em papel alumínio e acondicionados em gelo até a chegada no laboratório onde foram congelados em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a preparação das membranas plasmáticas.



**Figura 6:** Figura de amostras de brânquias anteriores, posteriores e músculo mandibular excisadas de *N.grnulata*.

### 3.3 Obtenção das membranas plasmáticas

As membranas plasmáticas das brânquias anteriores, brânquias posteriores e dos músculos mandibulares foram obtidas segundo Trapp (2005). Os tecidos das brânquias anteriores, posteriores e do músculo mandibular eram retirados de 10 a 15 animais e homogeneizados em homogeneizador tipo Potter - Elvehjem com pistilo de teflon, na presença de uma solução de homogeneização, contendo: 40 mM de Tris; 1mM de PMSF; 1mM de EDTA; 250mM de sacarose, pH 7,4.

O homogeneizado foi centrifugado a 3000 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC-5B, rotor SS 34). O sobrenadante obtido das brânquias foi filtrado devido a quitina branquial. Os sobrenadantes obtidos dos três tecidos foram centrifugados a 30.000 g, por 30 minutos a 4°C (Sorvall RC-5B, rotor SS 34). Na seqüência os precipitados formados foram ressuspensos em tampão contendo 25mM de HEPES e 1mM de PMSF com um homogeneizador tipo Dounce. Essa preparação foi incubada com tampão ácido acético 0,01M, 1/1 (v/v), pH 5,0, por 5 min a 25°C, com finalidade eliminar moléculas de insulina ligadas aos receptores de membrana. A reação foi interrompida com a adição de 40 mM de Tris-HCl gelado, pH 7,4, na proporção 2/1 (v/v), a mistura obtida foi centrifugada a 30.000 g, por 30 minutos a 4°C. Os precipitados resultantes desta etapa foram ressuspensos em Tris-HCl, pH 7,4 e representam as membranas cruas. As amostras foram separadas e uma alíquota de 20µl foi armazenada a -80°C e utilizada para dosagem da concentração de proteínas.

### **3.4 Ensaios da ligação da <sup>125</sup>I-insulina em presença de diferentes concentrações de insulina regular humana**

Para cada amostra de membrana foram utilizados tecidos (brânquias anteriores, posteriores e músculo mandibular) de 15 animais e cada ponto das curvas realizadas corresponde a média de 4 a 6 amostras em duplicata. Durante o período do estudo a cada estação / ano eram obtidas cerca de 2 a 3 amostras para realização deste protocolo experimental.

Cada preparação de membrana plasmática contendo 0,5 mg de proteína foi incubada, em duplicata, em agitador metabólico Dubnoff na presença de 0,2 ml de 10mM HEPES, 374mM NaCl, 1mM PMSF e 1% BSA, pH 7,4. A essa solução foram

adicionadas concentrações crescentes de insulina regular humana (Biohulin) não marcada (0; 0,21; 0,43; 2,15; 4,31 e 10,77 mM/ 0,2 mL) e 25.000 contagens / minuto de Tyr<sup>A14-125</sup>I-monoiodoinsulina humana (2.000 Ci/mmol Amersham). Após incubação por 120 minutos a 25°C (Kucharski e cols., 1997), a <sup>125</sup>I-insulina ligada às membranas foi separada do hormônio livre por filtração através de um filtro de microfibras de vidro (Whatman GF/B 2,4 cm) adaptado a uma bomba de vácuo. Os filtros foram lavados três vezes com 10 ml de tampão de incubação gelado contendo 0,1% de BSA e a radioatividade retida no filtro foi contada em contador gama LKB. A radioatividade absorvida pelo filtro na ausência de membranas foi menor que 0,2% da contagem total.

Com o objetivo de testar a especificidade da ligação da <sup>125</sup>I-insulina aos receptores, foram realizados experimentos utilizando-se membranas plasmáticas incubadas por 120 minutos a 25°C com <sup>125</sup>I-insulina (25 000 contagens/minuto) em presença ou ausência de prolactina ovina (250 µg/ ml), sendo processados com descrito anteriormente. A ligação total<sup>1</sup> da <sup>125</sup>I-insulina foi medida na ausência da insulina regular humana não marcada. A ligação inespecífica<sup>2</sup> foi determinada pela adição ao meio de incubação de <sup>125</sup>I-insulina mais um excesso de insulina humana não marcada 21,4 mM/ 0,2mL (500 µg / ml). A ligação específica<sup>3</sup> foi determinada pela subtração da ligação não específica da captação total (Sanvitto, 1992).

---

<sup>1</sup> Ligação Total (T): hormônio marcado ligado na ausência de hormônio nativo. Compreende o hormônio ligado especificamente aos receptores e aqueles ligados inespecificamente.

<sup>2</sup> Ligação Inespecífica (I): hormônio marcado ligado na presença de um excesso de hormônio nativo.

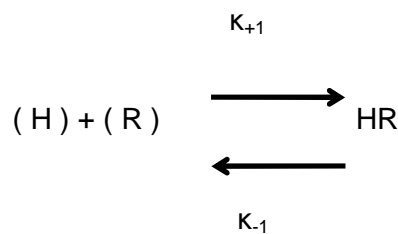
<sup>3</sup> Ligação Específica (B): hormônio marcado ligado somente a receptores (T-I).



### 3.4.1 Análise de Scatchard: medida da interação hormônio-receptor.

As ações celulares de um hormônio (H) iniciam com sua ligação específica ao receptor protéico (R) na célula alvo, esta ligação é mediada por interações não covalentes (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas). A interação hormônio-receptor desencadeia uma mudança na conformação do receptor a qual altera sua atividade biológica.

A interação hormônio e receptor forma um complexo que é reversível representado pela seguinte reação:



Onde  $K_{+1}$  e  $K_{-1}$  são as constantes de velocidade de associação e dissociação, respectivamente. Quando o sistema atinge o equilíbrio, para cada complexo de HR formado, dissocia-se um outro HR em H e R. A velocidade da reação é a mesma nos dois sentidos e a constante de associação ( $K_a$ ) e seu inverso a constante de dissociação ( $K_d$ ), podem ser calculadas como:

$$K_a = \frac{[HR]}{[H].[R]} = \frac{K_{+1}}{K_{-1}} = 1/K_d$$

Onde  $[HR]$  é a concentração do complexo hormônio-receptor,  $[H]$  é a concentração de hormônio livre e  $[R]$  é a concentração de receptores não ocupados. Quando metade dos receptores estiverem ligados ao hormônio,  $[R]$  será igual a  $[HR]$ . A constante de associação corresponde ao  $K_a$  e seu inverso  $K_d$  a constante de dissociação, assim a concentração de hormônio livre necessária para saturar metade

dos receptores será igual ao  $K_d$ . Dessa forma, os valores de  $K_d$  podem ser expressos em molaridade e utilizados como um índice de afinidade dos receptores. Pode-se estabelecer que quanto menor o  $K_d$ , maior a afinidade do hormônio por seu receptor e menor a tendência de dissociação do complexo hormônio receptor (Sanvitto, 1992; Kucharski, 1997; Trapp, 2005).

O método gráfico utilizado para análise dos dados da união de hormônios aos receptores foi o método de Scatchard (Scatchard, 1949). Uma vez que a ligação hormônio-receptor alcança o equilíbrio  $B_{\max} = [R] + [HR]$  e  $[R] = B_{\max} - [HR]$ , a expressão em equilíbrio pode ser descrita como:

$$K_a = \frac{[HR]}{[H] (B_{\max} - [HR])}$$

A partir da equação acima se pode obter a razão  $[HR] / [H]$ , para isso efetua-se a equação descrita abaixo onde, Bound (B)= hormônio ligado a receptor e Free (F)= hormônio não ligado.

$$\begin{aligned} \frac{[Bound]}{[Free]} &= \frac{[HR]}{[H]} = K_a (B_{\max} - [HR]) \\ &= \frac{1}{K_d} (B_{\max} - [HR]) \end{aligned}$$

Tratando-se da interação de um ligante homogêneo com uma população homogênea de receptores o gráfico de Scatchard (Bound/Free x Bound) resulta em uma reta; onde a inclinação da reta informa os valores da constante de associação, o -

$K_a$  ( $-1/K_d$ ) e a intersecção da reta com o eixo das abscissas indica a capacidade máxima de união, o  $B_{max}$ .

Para a análise dos dados dos experimentos de ligação da  $^{125}I$ -insulina às membranas plasmáticas de brânquias e de músculo e para a estimativa da curva de competição e dos valores de  $K_d$  e de  $B_{max}$  foi utilizado o programa RADILIG (Kell). Assim os valores de  $K_d$  e de  $B_{max}$  foram expressos em molaridade ( $10^{-12}M$ ) e utilizados, respectivamente, como índices de afinidade e da concentração total de receptores.

O gráfico de Scatchard da interação da insulina de vertebrados com seus receptores é curvilíneo com a concavidade voltada para cima. Nesse caso o  $K_d$  e o  $B_{max}$  são estimados a partir da dissociação da curva em dois componentes retilíneos e a decomposição da curva em duas retas que permitem calcular o  $K_d$  e o  $B_{max}$  de cada população de sítios.

Nos experimentos com membranas plasmáticas de brânquias e de músculo de *N.granulata* o  $K_d$  e o  $B_{max}$  foram calculados segundo modelo para receptores com um sítio de ligação. Após essa análise foram selecionadas as curvas que apresentaram estimativa de erro até 40 % e coeficiente de correlação (Coeficiente R) entre 0,90 e 0,99. Ainda nos casos em que a inclinação da curva mostrou tendência curvilínea foi realizado cálculo para o modelo de dois sítios de ligação, porém os resultados obtidos, em todos os casos, mostraram estimativa de erros muito elevados e um reduzido coeficiente de correlação em comparação ao cálculo para um sítio de ligação. Essas constatações, aliadas as informações correntes na literatura especializada e aos resultados obtidos anteriormente em artigos publicados por Kucharski e cols. (1999) com o mesmo animal, reforçaram a decisão na escolha do modelo de um sítio para o tratamento dos resultados da sazonalidade de ligação da  $^{125}I$ -insulina às membranas de brânquias e de músculo de *N.granulata*.

Para análise dos estudos de ligação da  $^{125}I$ -insulina às membranas de brânquias e de músculo de *N.granulata* foram utilizados cinco parâmetros:

- 1- porcentagem de ligação total da  $^{125}\text{I}$ -insulina em relação à radioatividade total oferecida;
- 2- porcentagem de hormônio ligado especificamente em relação ao total ligado;
- 3- competição da insulina não marcada com a insulina marcada;
- 4- análise gráfica da interação hormônio-receptor pelo método de Scatchard;
- 5- valores absolutos de constante de dissociação ( $K_d$ ) e da capacidade máxima de ligação ( $B_{\text{max}}$ ), obtidos através da análise de Scatchard.

A porcentagem de ligação total foi utilizada para evidenciar as diferenças sazonais e teciduais na presença de 6,25 fmol de  $^{125}\text{I}$ -insulina. Já a porcentagem de ligação específica foi utilizada para observar de maneira detalhada o comportamento deste parâmetro frente às aumentadas concentrações de insulina não marcada (mM/0,2mL). As curvas de competição associadas à representação do gráfico de Scatchard contribuem para a compreensão das variações sazonais da afinidade do complexo hormônio-receptor. Quanto ao  $K_d$  e ao  $B_{\text{max}}$  são índices de afinidade do complexo hormônio-receptor e da capacidade máxima de ligação do hormônio.

### 3.5 Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1

Para a realização dos experimentos de fosforilação, a obtenção das membranas plasmáticas foi realizada como descrito acima no item 3.2. Foram utilizadas de 4-8 preparações de membrana por tecido avaliado, assim a cada estação/ano cerca de 20 a 30 animais eram necessários.

Cerca de 40 $\mu\text{g}$  de proteína, de cada tecido, foram incubadas com três tratamentos: 200 nM de insulina bovina, 200nM de albumina bovina (controle) ou 500 $\mu\text{M}$  de genisteína + 200nM de insulina bovina, na presença de uma solução contendo 10mM de  $\text{MnCl}_2$ , 10mM de  $\text{MgCl}_2$  e 1mM de ortovanadato de sódio, em um volume final de 45 $\mu\text{l}$ , por 30 minutos, a 25°C, pH 7,8. A seguir foi adicionado 0,5  $\mu\text{Ci/mM}$  [ $\gamma$  $^{32}\text{P}$ ] ATP juntamente com ATP não marcado (5 $\mu\text{M}$ ) e incubado por 10 minutos a 25°C. Após foi

adicionado 1 mM do substrato sintético poly (Glu,Tyr) 4:1 e incubado por mais uma hora a 25°C. A reação foi interrompida, pipetando-se a amostra do meio de incubação em um papel de fosfocelulose. Seguiu-se uma lavagem com TCA a 10% e três lavagens com ácido fosfórico (75mM). Após secagem os papéis foram colocados em líquido de cintilação e a incorporação de [ $\delta^{32}\text{P}$ ] ATP ao substrato exógeno foi medida em um contador beta LKB (Kucharski, 1997; Trapp, 2005).

Os grupos albumina (controle) e insulina + genisteína (inibição TK) foram incluídos nos experimentos realizados a cada estação e compilados para análise final dos resultados.

### **3.6 Captação de Glicose e Aminoácidos Neutros**

Para os experimentos de captação cerca de 15 a 20 animais/estação/ano foram capturados manualmente no sedimento areno-lodoso, dentro da água ou nas tocas e transferidos até o laboratório em caixas plásticas com água do próprio local. No laboratório a hemolinfa foi retirada e os animais permaneceram 24 h em jejum, com aeração constante, sob fotoperíodo natural e temperatura ambiente até o momento do experimento.

Para avaliar a captação de glicose e de aminoácidos neutros pelas brânquias anteriores, posteriores e pelo músculo mandibular a incubação de cada composto analisado foi realizada com 5-6 animais/estação/ano (inverno: junho, julho e agosto; primavera: setembro, outubro e novembro; verão: dezembro; janeiro e fevereiro; outono: março, abril e maio). Cada animal, após crioanestesia (15 minutos), teve a carapaça e a mandíbula removidas e os tecidos excisados (sobre placa de Petri acondicionada em gelo) e incubados imediatamente. Foram utilizadas as três últimas brânquias anteriores e posteriores e o músculo mandibular. No caso das brânquias, a cutícula de quitina foi cortada e os tecidos imediatamente lavados em tampão.

Amostras de músculo ( $\pm 50\text{mg}$ ), de brânquias anteriores e posteriores ( $\pm 100\text{mg}$  de cada) foram incubadas em  $500\mu\text{l}$  de solução fisiológica para caranguejo ( $770\text{ mOsm}$ ,  $374\text{ mM NaCl}$ ,  $10\text{ mM KCl}$ ,  $25\text{ mM CaCl}_2$ ,  $10\text{ mM MgCl}_2$ ,  $8,8\text{ mM H}_3\text{BO}_3$ ,  $10\text{ mM HEPES}$ ,  $0,1\text{ mM}$  fenilmetilsufonil fluoride (PMSF),  $\text{pH } 7,8$ ), acrescidas de  $0,2\ \mu\text{Ci}$  de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  2-deoxi-D-glicose ( $39\text{mCi / mmol}$ -Amersham),  $0,2\ \mu\text{Ci}$  de  $3\text{-O-}^{14}\text{C}$  metil-D-glicose ( $53\text{mCi/mmol}$ , Amersham) ou  $0,2\ \mu\text{Ci}$  de  $1\text{-}^{14}\text{C}$  MeAIB- ácido metil aminoisobutírico ( $250\text{ mCi/mmol}$ , Du Pont). Após  $120\text{ min}$  de incubação, as amostras de tecidos foram removidas do meio, lavadas duas vezes em solução fisiológica gelada (com o objetivo de retirar o excesso de radioatividade absorvida ao tecido), secas em papel filtro e colocadas em frascos com tampa rosca contendo  $1\text{ml}$  de água destilada. Após, esses frascos foram congelados e fervidos por três vezes, consecutivas, para romper as células e liberar os aminoácidos ou a glicose captada pelas células. Esse conteúdo liberado foi considerado o meio interno e o meio de incubação, o meio externo.

De cada amostra foram retirados  $100\mu\text{l}$  do meio interno ou do meio externo e colocados em líquido de cintilação e a radioatividade foi medida em contador LKB. Os resultados foram expressos como a relação tecido / meio (T/M), isto é,  $\text{cpm / ml}$  de fluido de tecido dividido por  $\text{cpm / ml}$  do meio de incubação.

### 3.7 Extração do RNA total

Para a extração do RNA a cada estação/ano 4 animais foram coletados, crioanestesiados por  $15\text{ min}$ , e os tecidos branquial anterior, posterior e muscular foram rapidamente excisados. O RNA total de cada amostra foi extraído com o uso de solução de Trizol (Trizol<sup>®</sup>, Gibco BRL, USA), de acordo com o método de Chomczynski e Sacchi (1987).

### 3.8 Determinação do mRNA da região tirosina quinase do receptor *insulin-like* de brânquias anteriores, posteriores e de músculo mandibular: análise por PCR (polymerase chain reaction)

A síntese do cDNA foi feita a partir de 2µg de RNA total, utilizando-se oligonucleotídeos complementares à cauda de poli A do mRNA. Todos os reagentes foram provenientes do SuperScript™ First-Strand. O cDNA produzido foi utilizado para a amplificação por PCR de uma seqüência de 118pb (CGIRLTK- *Chasmagnathus granulatus* Insulin Receptor Like Tyrosine Kinase) e de uma seqüência de 382 pb do 16S, usado como normalizador. Neste estudo foram empregados oligonucleotídeos (*primers*) específicos, de regiões conservadas, para o caranguejo *N.granulata* (Tab. 3.1).

**Tabela 1:** Características dos oligonucleotídeos para reação de PCR

Gene	Primers	Produto (pb)	GenBank N°
<b>CGIRLTK</b>			
Sense	5´ - ATT GCG GAT GGC ATG GCA TAC - 3	118	DQ104241
Antisense	5´ - GTC TCC GAT CTT GAG CGT GAG – 3´		
<b>16S</b>			
Sense	5´ - TAG CAT AAT CGT TAG TTT TTT AAT T - 3´	382	AJ250640
Antisense	5´ - TTA AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA – 3´		

As reações em cadeia de polimerase (PCR) do CGIRLTK foi realizada com sistema Q - solution (Qiagen), seguindo adaptação do protocolo sugerido pelo fabricante. As reações de PCR foram executadas com um volume final de 50 µl contendo 2 µl de cDNA e 1 pmol de cada primer. As amplificações foram realizadas por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, acoplamento a 58°C por 1 min e 72°C por 1 min e o passo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

As reações de PCR do 16S foram executadas em volume final de 50µl contendo: 1,5 mmol<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 pmol de cada primer, 2 µl de cDNA e 1 U de Taq DNA polimerase (Gibco). O PCR foi realizado usando 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, acoplamento a 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e o passo de extensão final a 72 °C por 10 min. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os produtos das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (low melting 2%), corado com brometo de etídio e analisado pelo sistema radioanalítico de imagens o ImageMaster<sup>®</sup> Vídeo Documentation System (Pharmacia Biotech).

#### **4 Determinações Bioquímicas**

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976). Os níveis de glicose da hemolinfa foram determinados pelo método enzimático da glicose oxidase com o Kit GLICOSE-PAP (Labtest). Para as dosagens foram utilizados 40 µL de hemolinfa e uma curva padrão com estes valores foi elaborada. Os resultados foram expressos em mmol/L.



## 5 Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média, com exceção dos valores de osmolalidade da água os quais foram expressos como mediana e percentis 25% e 75 %. Para comparação entre as estações ou diferentes tratamentos foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo *Student-Newmann-Keuls* (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas se  $p \leq 0,05$ . O efeito do pH na água e hemolinfa, temperatura da água e do ar e a osmolalidade da água e da hemolinfa foi examinado em relação a cada variável experimental obtida e calculado o coeficiente de correlação de *Pearson* a cada estação, sendo considerado significativo  $p \leq 0,05$ . Os testes estatísticos foram realizados com o programa *Sigma Stat 2.0*. A análise dos sítios de ligação à insulina foi realizada com o programa RADILIG (Kell 6.0, Biosoft).

# RESULTADOS

---

## 1 Avaliação Sazonal de Fatores Abióticos do Ambiente Estuarino e da Osmolalidade e do pH da Hemolinfa de *N.granulata*

A Tabela 2 mostra os valores de osmolalidade (mOsm/ Kg de H<sub>2</sub>O) e pH (log [H<sup>+</sup>]) da água e da hemolinfa e as temperaturas (°C) da água e do ar registradas durante as diferentes estações dos dois anos analisados neste trabalho. Constatou-se que a osmolalidade da água da lagoa foi 5-6 vezes maior ( $p > 0,05$ ) no verão quando comparada àquelas verificadas nas demais estações do ano. Entretanto, em função da grande variabilidade intra-estação, não houve diferença estatística.

A osmolalidade da hemolinfa do *N.granulata* mostra que no verão os valores foram menores ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao inverno, a primavera e ao outono.

No outono e no inverno a água do estuário apresentou valores de pH mais elevados ( $p \leq 0,05$ ) que aqueles constatados na primavera e no verão. No outono houve um aumento ( $p \leq 0,05$ ) do pH da água, inversamente ao constatado para a hemolinfa na mesma estação.

A temperatura ambiente oscilou entre  $18,5 \pm 0,7$  °C no inverno a  $32 \pm 2,8$  °C no verão. A temperatura da água, medida aproximadamente 0,5 m da margem, não mostrou alteração significativa em relação à temperatura do ar. Durante as coletas observou-se que em condições de chuva, de ventos fortes, de aumento da maré e de temperaturas extremamente altas ( $\geq 35$ °C) ou baixas ( $\leq 15$  °C) os caranguejos *N.granulata* permaneciam em suas tocas não sendo encontrados no ambiente aquático. Esses fatores isolados ou associados impediram a coleta dos animais nessas ocasiões.

**Tabela 2:** Medidas de osmolalidade, de pH e de temperatura do ambiente estuarino e de pH e de osmolalidade da hemolinfa de *N.granulata*

	Osmolalidade mOsm / Kg H <sub>2</sub> O			Hemolinfa	pH -log [H]		Temperatura °C	
	Água				Água	Hemolinfa	Água	Ar
	25%	MD	75%					
<b>Inverno</b>	41	145	170	967 ± 85	8,2 ± 0,04 <sup>ab</sup>	7,6 ± 0,35	17 ± 0,7	18,5 ± 0,6
<b>Primavera</b>	81	96	118	876 ± 134	8,0 ± 0,02 <sup>*</sup>	7,7 ± 0,02	24,6 ± 2,5	26 ± 2,0
<b>Verão</b>	97	529	582	833 ± 67 <sup>a</sup>	7,8 ± 0,28	7,6 ± 0,03	29,0 ± 1,4	32 ± 2,8
<b>Outono</b>	54	112	136	883 ± 122	8,4 ± 0,01 <sup>ab</sup>	7,1 ± 0,06 <sup>c</sup>	18 ± 0,5	19 ± 1,0

Resultados de osmolalidade da água expressos como mediana e percentis 25 e 75 %, respectivamente. Resultados de osmolalidade da hemolinfa, pH e temperatura expressos como média ± desvio padrão.

\* p ≤ 0.05 em comparação a hemolinfa.

<sup>a</sup> p ≤ 0.05 em comparação ao inverno, primavera e outono.

<sup>b</sup> p ≤ 0.05 em comparação a primavera e verão.

<sup>c</sup> p ≤ 0.05 em comparação ao inverno, primavera e verão.

Número da amostra- 6 a 8

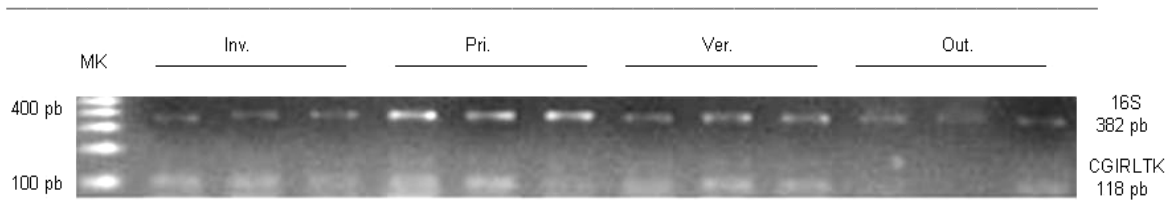
---

## **2 Expressão do CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* Insulin Receptor Like Tyrosine Kinase) nos tecidos branquial e muscular: alteração sazonal**

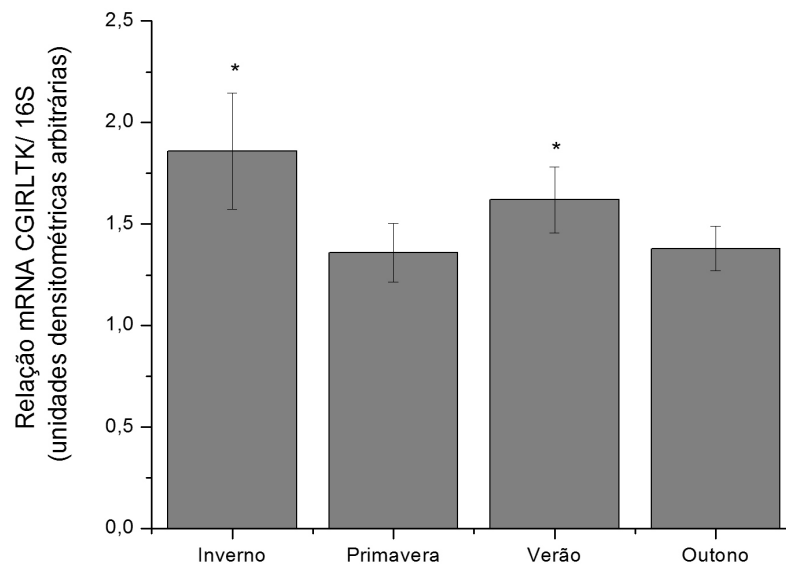
Nas figuras 7 a 12 estão representados os resultados da avaliação sazonal da expressão do gene CGIRLTK em brânquias posteriores, brânquias anteriores e músculo mandibular do caranguejo *N.grnulata*.

O tecido branquial posterior mostrou um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) da concentração de mRNA durante as estações de inverno e de verão (Fig.7). Ainda, neste tecido, evidencia-se uma reduzida expressão do gene CGIRLTK na primavera e no outono, quando comparada ao 16S (Fig.8). Já nas brânquias anteriores a expressão do CGIRLTK permaneceu inalterada durante as quatro estações do ano (Fig. 9 e 10).

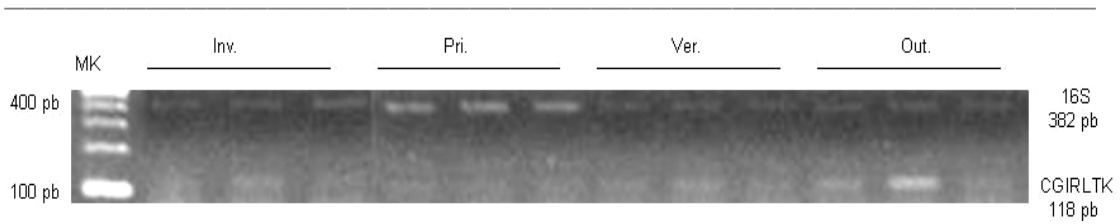
Na primavera a concentração de mRNA CGIRLTK no tecido muscular foi 70% ( $p \leq 0,05$ ) maior do que aquelas constatadas nas outras três estações do ano (Fig. 11 e 12).



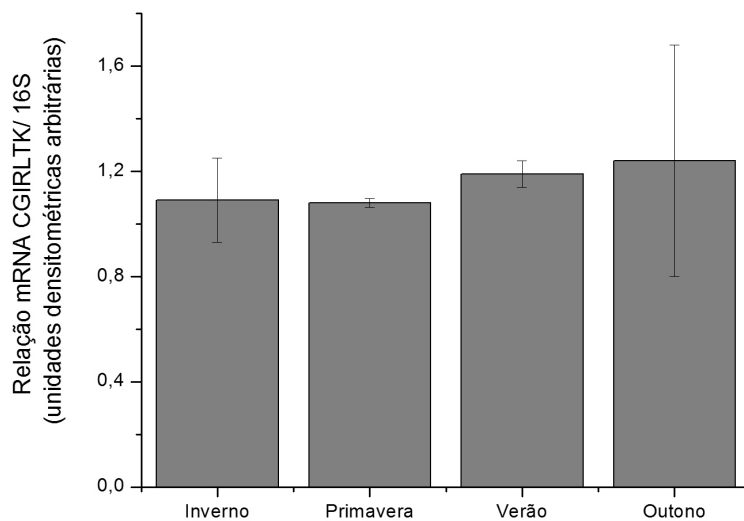
**Figura 7:** PCR do gene CGIRLTK, analisado em gel de agarose (low melting 2%), do tecido branquial posterior de *N.granulata*. Amostras obtidas no inverno (Inv), primavera (Pri), verão (Ver) e outono (Out). O fragmento amplificado corresponde ao transcrito do gene CGIRLTK e possui aproximadamente 118 pb (direita). A quantificação das bandas foi corrigida pela expressão do 16S com 382 pb (direita). A esquerda está indicado o tamanho do marcador (MK).



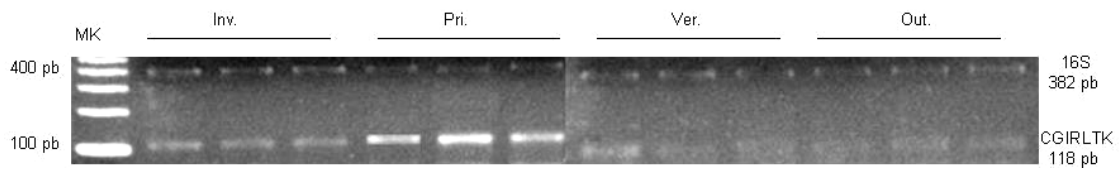
**Figura 8:** Sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* insulin receptor like tyrosine kinase) em brânquias posteriores de *N.granulata*. Análise da relação de unidades densitométricas (arbitrárias) da concentração de mRNA CGIRLTK e mRNA16S (normalizador). Os resultados são representativos de três animais por estação e expressos como média  $\pm$  DP. \* indica diferença estatística significativa  $p \leq 0,05$  em comparação a primavera e ao outono.



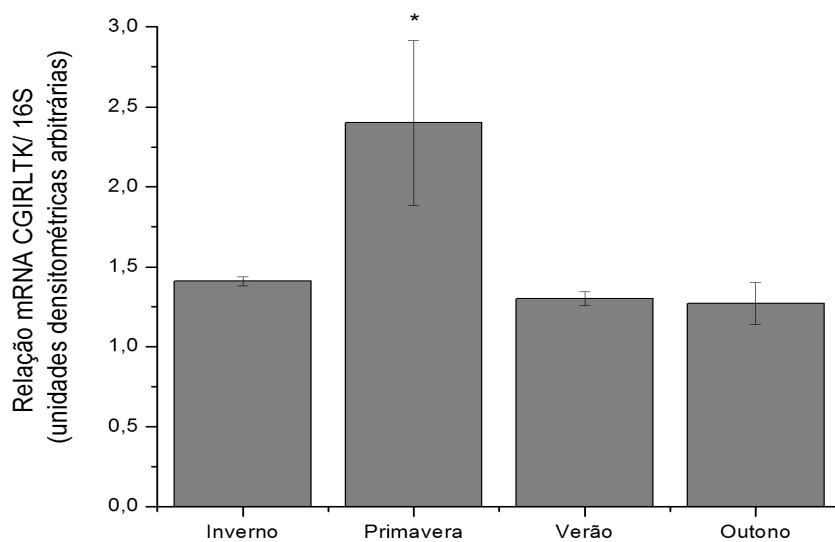
**Figura 9:** PCR do gene CGIRLTK, analisado em gel de agarose (low melting 2%), do tecido branquial anterior (BA) de *N.granulata*. Amostras obtidas no inverno (Inv), primavera (Pri), verão (Ver) e outono (Out). O fragmento amplificado corresponde ao transcrito do gene CGIRLTK e possui aproximadamente 118 pb (direita). A quantificação das bandas foi corrigida pela expressão do 16S com 382 pb (direita). A esquerda está indicado o tamanho do marcador (MK).



**Figura 10:** Sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* insulin receptor like tyrosine kinase) em brânquias anteriores de *N.granulata*. Análise da relação de unidades densitométricas (arbitrárias) da concentração de mRNA CGIRLTK e mRNA16S (normalizador). Os resultados são representativos de três animais por estação e expressos como média  $\pm$  DP.



**Figura 11:** PCR do gene CGIRLTK, analisado em gel de agarose (low melting 2%), do tecido muscular de *N.granulata*. Amostras obtidas no inverno (Inv), primavera (Pri), verão (Ver) e outono (Out). O fragmento amplificado corresponde ao transcrito do gene CGIRLTK e possui aproximadamente 118 pb (direita). A quantificação das bandas foi corrigida pela expressão do 16S com 382 pb (direita). A esquerda está indicado o tamanho do marcador (MK).



**Figura 12:** Sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK (*Chasmagnathus granulata* insulin receptor like tyrosine kinase) em músculo mandibular de *N.granulata*. Análise da relação de unidades densitométricas (arbitrárias) da concentração de mRNA CGIRLTK e mRNA16S (normalizador). Os resultados são representativos de três animais por estação e expressos como média  $\pm$  DP. \* indica diferença estatística significativa  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, ao verão e ao outono.

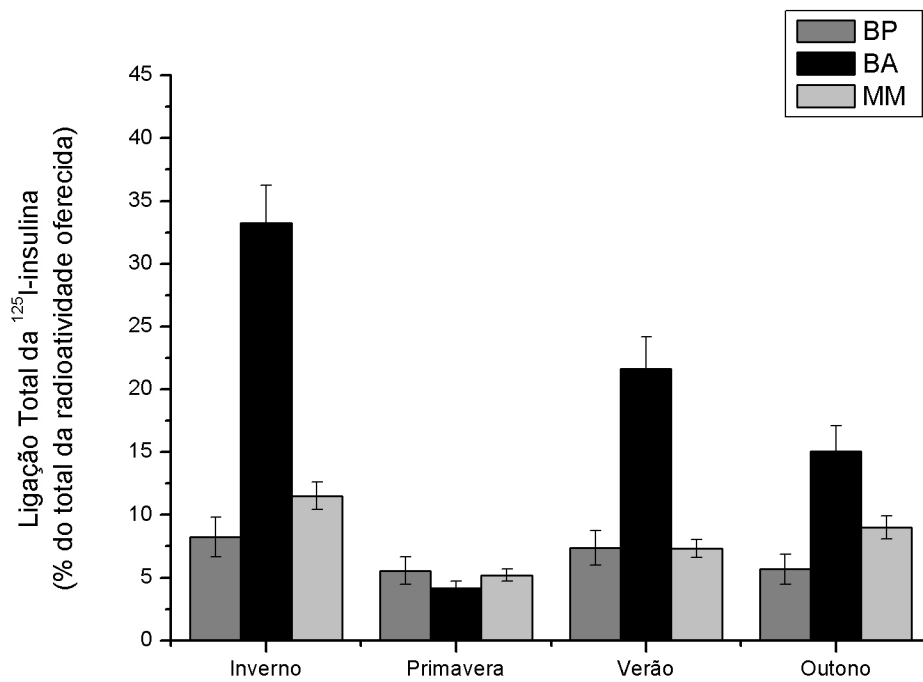


---

### **3 Estudos de Ligação da <sup>125</sup>I-insulina às Membranas Celulares de Brânquias Anteriores e Posteriores e Músculo de *N.granulata***

#### **3.1 Porcentagem de Ligação Total da <sup>125</sup>I-insulina às Membranas Celulares de Brânquias Posteriores, de Brânquias Anteriores e de Músculo Mandibular**

A figura 13 representa a variação sazonal da porcentagem de ligação total (ligação específica + inespecífica) da <sup>125</sup>I-insulina em membranas celulares de brânquias posteriores, de brânquias anteriores e de músculo mandibular de *N.granulata*, incubadas durante 120 minutos a 25 °C com 6,25 fmol de <sup>125</sup>I-insulina. As brânquias anteriores é o órgão que apresenta a maior captação total de <sup>125</sup>I-insulina: 33%, 22% e 15% no inverno, no verão e no outono, respectivamente. As brânquias posteriores e o músculo apresentam em média 6% e 10%, respectivamente, de captação total de <sup>125</sup>I-insulina no inverno, no verão e no outono. Entretanto, na primavera constata-se que a captação total de <sup>125</sup>I-insulina reduz marcadamente nos três tecidos, chegando a valores entre 5% e 4%.



**Figura 13:** Porcentagem de ligação total da  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas de brânquias posteriores, de brânquias anteriores e de músculo de *N. granulata* nas quatro estações do ano.

### 3.2 Porcentagem de Ligação Específica da $^{125}\text{I}$ -insulina às Membranas Celulares de Brânquias Posteriores, de Brânquias Anteriores e de Músculo Mandibular: alteração sazonal

A ligação específica aos receptores é determinada pela subtração da ligação inespecífica (resultado da curva de incubação da  $^{125}\text{I}$ -insulina mais crescentes concentrações de insulina não marcada) da capacidade de ligação total aos receptores (ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina na ausência de insulina não marcada).

---

A variação sazonal da porcentagem de ligação específica da  $^{125}\text{I}$ -insulina quando as membranas de brânquias posteriores, de brânquias anteriores e de músculo mandibular foram incubadas em presença de concentrações crescentes (0 a 10,7 mM/0,2mL) de insulina regular humana e 6,25 fmol de  $^{125}\text{I}$ -insulina são mostradas nas tabelas 3 a 5.

Nas brânquias posteriores a porcentagem de ligação, na ausência de hormônio não marcado, foi elevada ( $p \leq 0,05$ ) no inverno e no verão, respectivamente (Tab.3). No inverno, quando as membranas de brânquias foram incubadas com 4,3 e 10,7 mM de insulina humana não marcada constata-se uma redução de 3 a 6 vezes, respectivamente, na porcentagem de ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina (Tab.3). Nas demais estações a ligação específica, na presença de 10,7 mM, foi em média 4,5 vezes menor em relação à porcentagem de ligação inicial (Tab.3).

Quanto às brânquias anteriores a porcentagem de ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina, na ausência de insulina não marcada, foi significativamente elevada no inverno, em comparação a demais estações (Tab. 4). Entretanto, no verão verifica-se uma queda marcante, de 8 a 24 vezes, da porcentagem de ligação específica inicial na presença de 4,3 e 10,7 mM de insulina (Tab.4).

No tecido muscular, na ausência de insulina não marcada, a porcentagem de ligação não mostrou diferença estatística entre as quatro estações. (Tab.5). No verão, na primavera e no inverno a ligação inicial diminui de 2 a 2,5 vezes, respectivamente, na presença de 4,3 e 10,7 mM de insulina. Já no outono a porcentagem de ligação específica da  $^{125}\text{I}$ -insulina altera-se pouco frente a aumentadas concentrações de insulina (Tab. 5). Ainda a ligação específica inicial diminui de 1,4 a 1,7 vezes quando 4,3 e 10,7 mM de insulina regular humana não marcada são adicionadas ao meio de incubação no outono (Tab. 5).

**Tabela 3:** Porcentagem de Ligação Específica da <sup>125</sup>I- insulina em Presença de Diferentes Concentrações de hormônio em Membranas de Brânquias Posteriores de *N.granulata*: sazonalidade

	Insulina humana ( mM/ 0,2 mL)					
	0	0,2	0,4	2,1	4,3	10,7
<b>Inverno</b>	48 ± 3,4 <sup>a</sup>	41 ± 6,6 <sup>a</sup>	36 ± 4,3 <sup>ab</sup>	31 ± 6,1 <sup>a</sup>	15 ± 2,9 <sup>a</sup>	8 ± 0,33 <sup>a</sup>
<b>Primavera</b>	29 ± 7,4 <sup>b</sup>	28 ± 7,4 <sup>b</sup>	27 ± 6,6 <sup>a</sup>	18 ± 4,4 <sup>b</sup>	17 ± 2,2 <sup>a</sup>	6 ± 0,76 <sup>a</sup>
<b>Verão</b>	45 ± 4,7 <sup>a</sup>	44 ± 6,2 <sup>a</sup>	41 ± 4,6 <sup>b</sup>	39 ± 4,6 <sup>a</sup>	37 ± 0,10 <sup>b</sup>	10 ± 0,5 <sup>b</sup>
<b>Outono</b>	26 ± 2,4 <sup>b</sup>	22 ± 1,8 <sup>b</sup>	10 ± 0,9 <sup>c</sup>	8 ± 2,7 <sup>c</sup>	7 ± 1,8 <sup>c</sup>	6 ± 0,4 <sup>a</sup>

Letras diferentes indicam  $p \leq 0,05$  entre as estações.

N = 6 experimentos em duplicata para cada estação.

**Tabela 4:** Porcentagem de Ligação Específica da <sup>125</sup>I- insulina em Presença de Diferentes Concentrações de hormônio em Membranas de Brânquias Anteriores de *N.granulata*: sazonalidade

	Insulina humana ( mM/ 0,2 mL)					
	0	0,2	0,4	2,1	4,3	10,7
<b>Inverno</b>	65 ± 2,9 <sup>a</sup>	64 ± 6,5 <sup>a</sup>	46 ± 3,0 <sup>ab</sup>	26 ± 3,3 <sup>a</sup>	16 ± 4,8 <sup>a</sup>	12 ± 0,6 <sup>a</sup>
<b>Primavera</b>	21 ± 7,2 <sup>b</sup>	13 ± 0,6 <sup>b</sup>	11 ± 2,4 <sup>b</sup>	8 ± 0,8 <sup>b</sup>	7 ± 2,2 <sup>b</sup>	6 ± 0,4 <sup>b</sup>
<b>Verão</b>	48 ± 9,6 <sup>c</sup>	43 ± 5,7 <sup>c</sup>	30 ± 3,6 <sup>c</sup>	16 ± 3,1 <sup>c</sup>	6 ± 0,71 <sup>b</sup>	2 ± 0,1 <sup>c</sup>
<b>Outono</b>	47 ± 6,1 <sup>c</sup>	33 ± 2,6 <sup>c</sup>	27 ± 6,7 <sup>c</sup>	23 ± 2,2 <sup>c,a</sup>	13 ± 0,6 <sup>a</sup>	8 ± 0,4 <sup>a,b</sup>

Letras diferentes indicam  $p \leq 0,05$  entre as estações.

N = 6 experimentos em duplicata para cada estação.

**Tabela 5:** Porcentagem de Ligação Específica da <sup>125</sup>I- insulina em Presença de Diferentes Concentrações de hormônio em Membranas de Músculo Mandibular de *N.granulata*: sazonalidade

	Insulina humana ( mM/ 0,2 mL)					
	0	0,2	0,4	2,1	4,3	10,7
<b>Inverno</b>	39 ± 5,8	33 ± 4,9	32 ± 4,8 <sup>a</sup>	29 ± 4,3 <sup>a</sup>	19 ± 2,8 <sup>a</sup>	14 ± 2,1 <sup>a</sup>
<b>Primavera</b>	38 ± 5,7	33 ± 4,6	29 ± 4,3 <sup>b</sup>	26 ± 3,9 <sup>a</sup>	20 ± 3,2 <sup>a</sup>	17 ± 2,5 <sup>a</sup>
<b>Verão</b>	51 ± 7,2	42 ± 6,3	40 ± 6,3 <sup>a</sup>	33 ± 4,9 <sup>a,b</sup>	26 ± 3,9 <sup>a</sup>	20 ± 3,1 <sup>a</sup>
<b>Outono</b>	47 ± 6,3	45 ± 6,7	42 ± 6,7 <sup>a</sup>	39 ± 5,8 <sup>b,c</sup>	33 ± 4,9 <sup>b</sup>	27 ± 0,4 <sup>b</sup>

Letras diferentes indicam  $p \leq 0,05$  entre as estações.

N = 4 experimentos em duplicata para cada estação.

### 3.3 Curvas Representativas da Competição de Insulina Não Marcada e $^{125}\text{I}$ -insulina Pela Ligação às Membranas Celulares de Brânquias e Músculo de *N.granulata*: sazonalidade

As curvas de competição representativas mostradas nas figuras 14 a 16 mostram que concentrações crescentes de insulina humana não marcada (0 a 10 mM/ 0,2mL), incubadas com 6,2 fmol de hormônio marcado ( $^{125}\text{I}$ -insulina, 25 000 CPM), diminuem a porcentagem de ligação máxima de  $^{125}\text{I}$ -insulina em membranas plasmáticas de brânquias e de músculo de *N.granulata*.

Para melhor representação gráfica das curvas de competição as concentrações de insulina não marcada utilizadas (0; 0,2; 0,4; 2,1; 4,3 e 10,7 mM) foram convertidas a micromoles e mostradas em escala logarítima (log  $\mu\text{M}$ ).

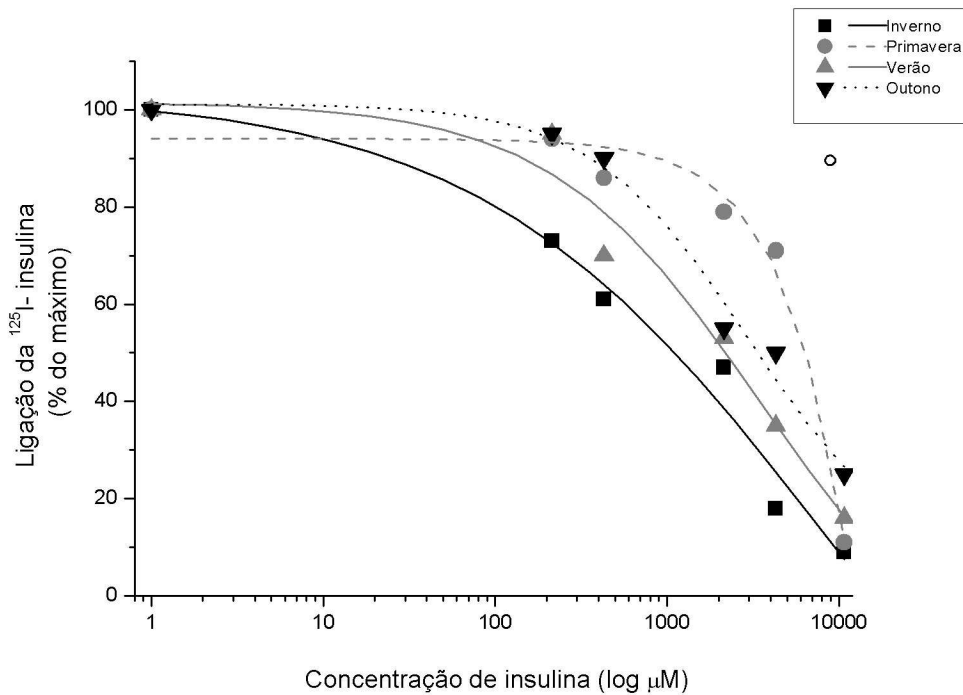
A oPRL (250  $\mu\text{g}$  / mL) não foi capaz de competir com a  $^{125}\text{I}$ - insulina pela ligação aos sítios receptores nas membranas plasmáticas dos tecidos estudados (Fig. 14 a 16).

A análise sazonal das curvas mostra que nas brânquias posteriores a maior competição da insulina não marcada com a  $^{125}\text{I}$ -insulina ocorreu no inverno, com uma porcentagem de ligação máxima de apenas 47% e 9% na presença de 2,1 e 10,7 mM de insulina, respectivamente (Fig. 14). No verão a insulina humana não marcada, na concentração de 0,2 mM reduz a porcentagem de ligação máxima para 70% e na presença de 10,7 mM a ligação máxima foi de 16% (Fig. 14). Já na primavera, a porcentagem de ligação se manteve entre 90% e 70% na presença de 0,2 a 4,3 mM de insulina, contudo quando 10,7 mM de insulina foram adicionados ao meio de incubação a porcentagem de ligação diminui para 11% (Fig.14).

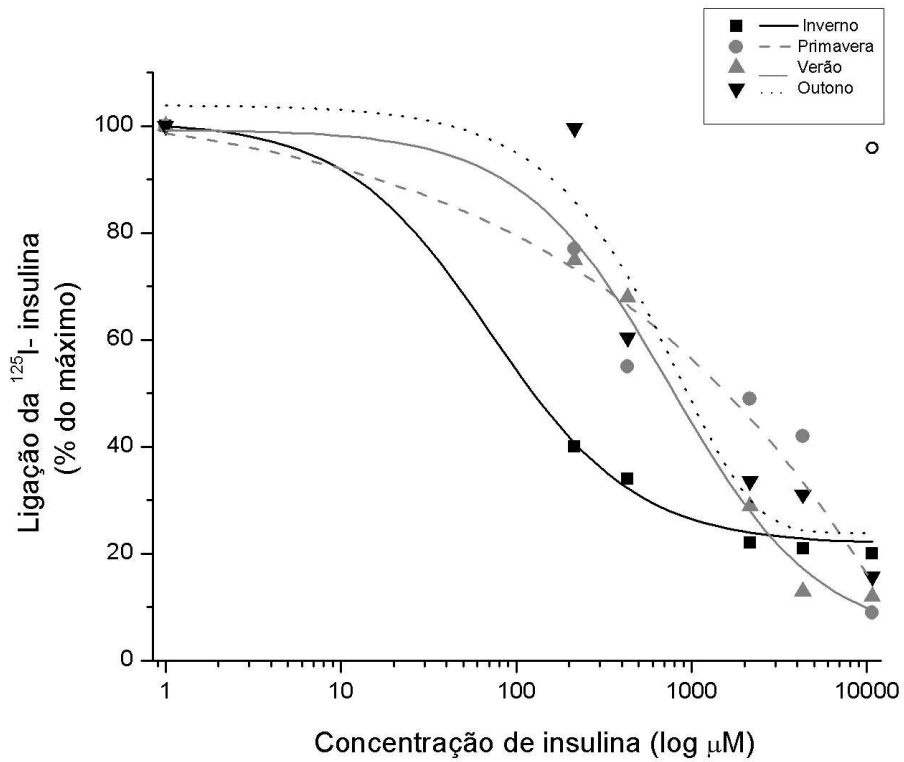
Nas brânquias anteriores a avaliação sazonal das curvas evidencia uma elevada competição da insulina não marcada com a  $^{125}\text{I}$ -insulina no inverno e no verão. No inverno, a porcentagem de ligação máxima da  $^{125}\text{I}$ -insulina às membranas de brânquias

anteriores diminuí para 40% na presença de 0,2 mM de insulina e 20% com 10,7 mM (Fig. 15). Já no verão a porcentagem de ligação máxima foi de 75% na presença de 0,2 mM de insulina, reduzindo para 12% com 10,7 mM (Fig. 15).

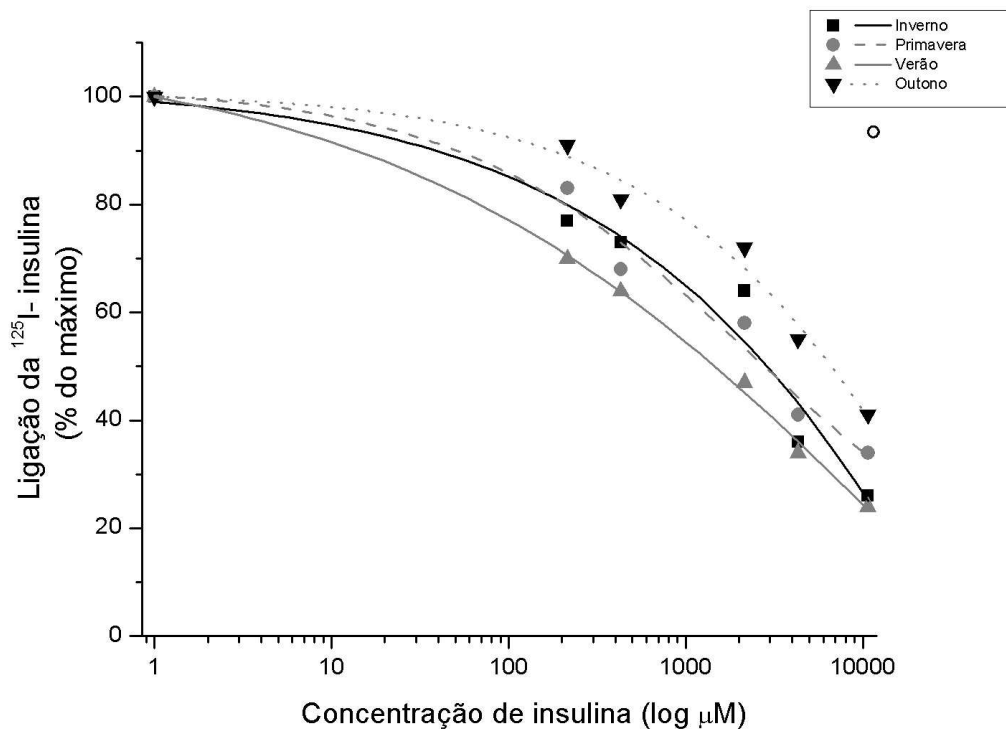
Em relação ao tecido muscular observa-se que a maior competição entre a insulina não marcada e a <sup>125</sup>I-insulina ocorreu no verão, com uma redução da porcentagem ligação máxima para 70% na concentração de 0,2 mM de insulina, alcançando 24% com 10,7 mM (Fig. 16).



**Figura 14:** Curvas representativas da competição da insulina não marcada com a <sup>125</sup>I-insulina pela ligação às membranas de brânquias posteriores de *N.granulata*: comparação sazonal. Inibição competitiva pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. A prolactina ovina (O) não causou competição.



**Figura 15:** Curvas representativas da competição da insulina não marcada com a <sup>125</sup>I-insulina pela ligação às membranas de brânquias anteriores de *N. granulata*: comparação sazonal. Inibição competitiva pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. A prolactina ovina (O) não causou competição.



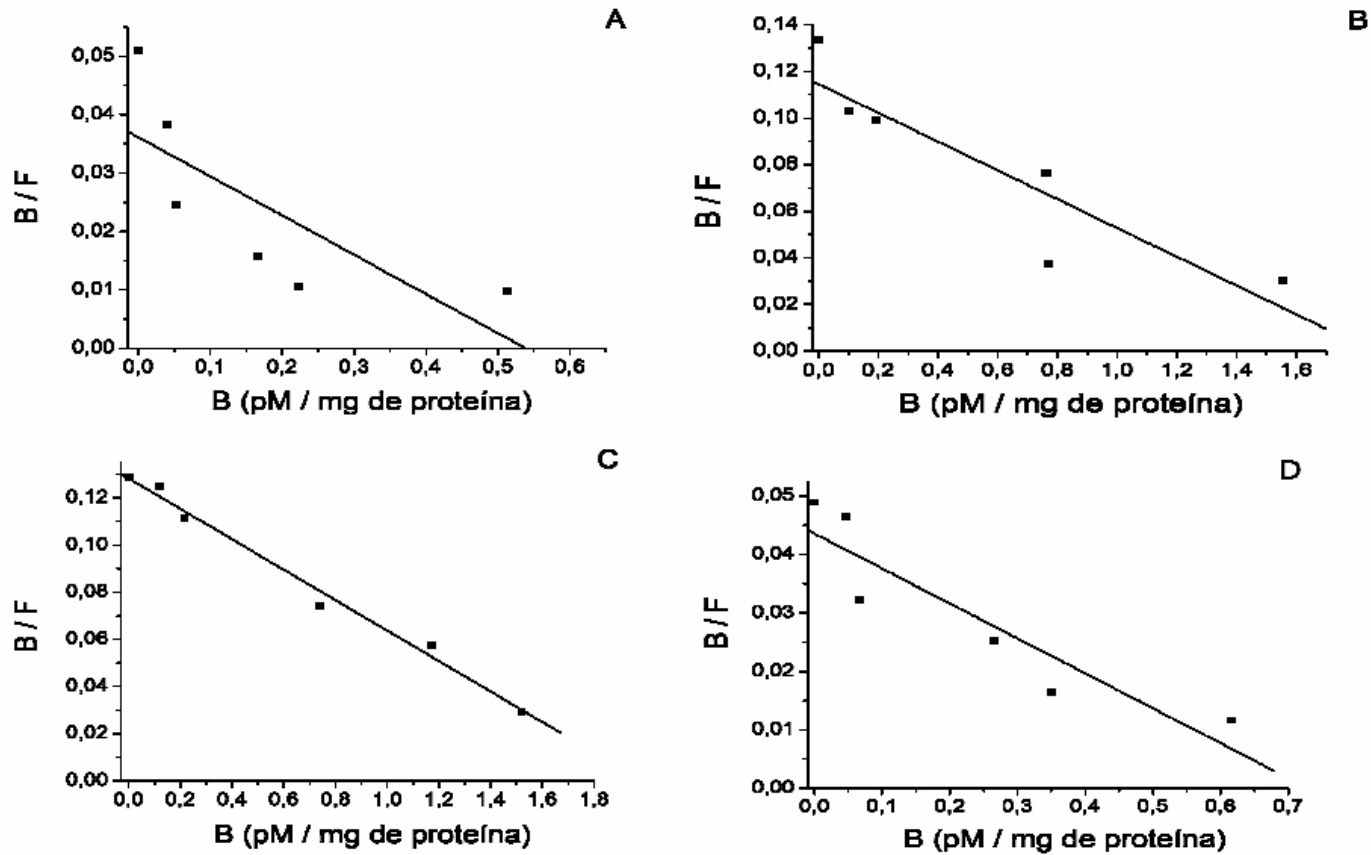
**Figura 16:** Curvas representativas da competição da insulina não marcada com a <sup>125</sup>I-insulina pela ligação a membranas de músculo mandibular de *N.granulata*: comparação sazonal. Inibição competitiva pelo aumento da concentração de insulina humana não marcada. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. A prolactina ovina (O) não causou competição.



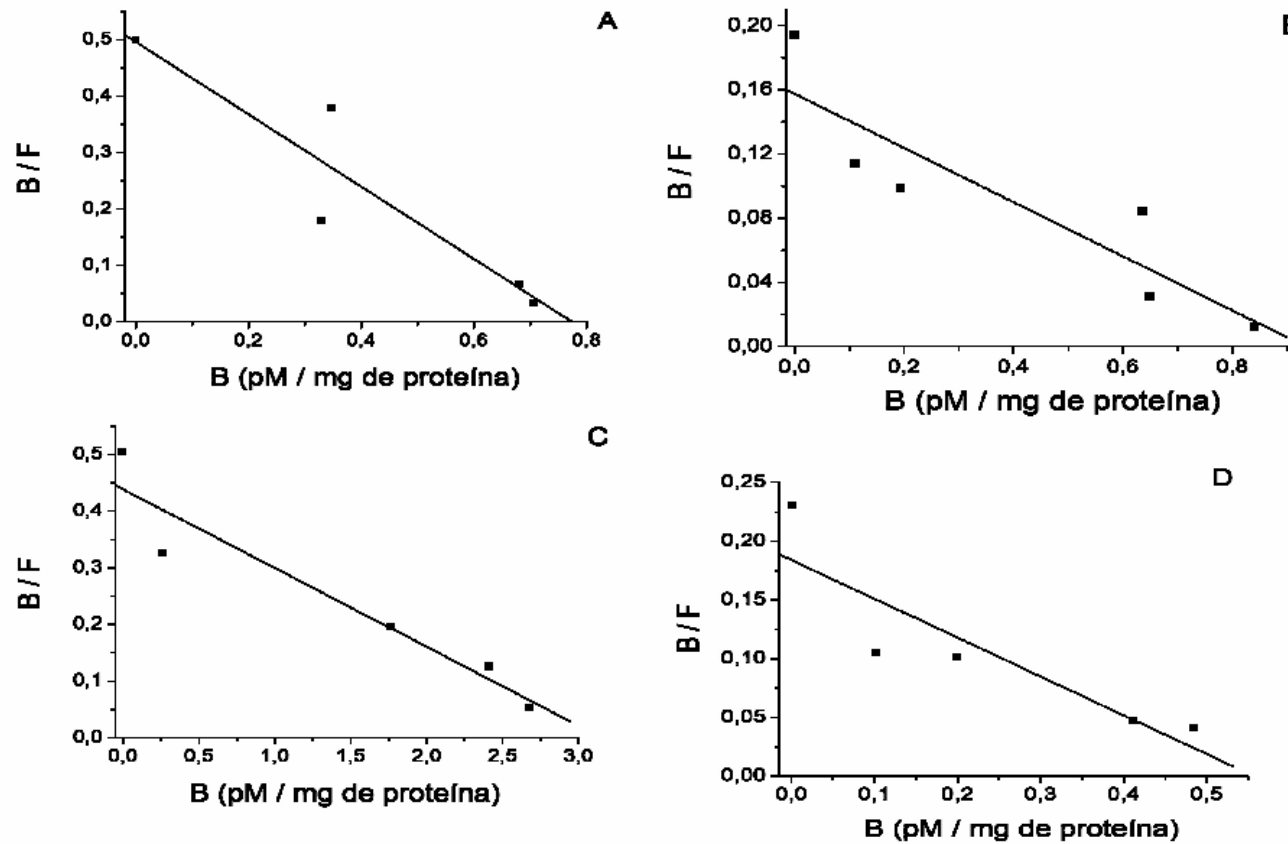
---

### 3.4 Características de ligação da $^{125}\text{I}$ - insulina em membranas de brânquias e músculo de *N.granulata*: análise de Scatchard

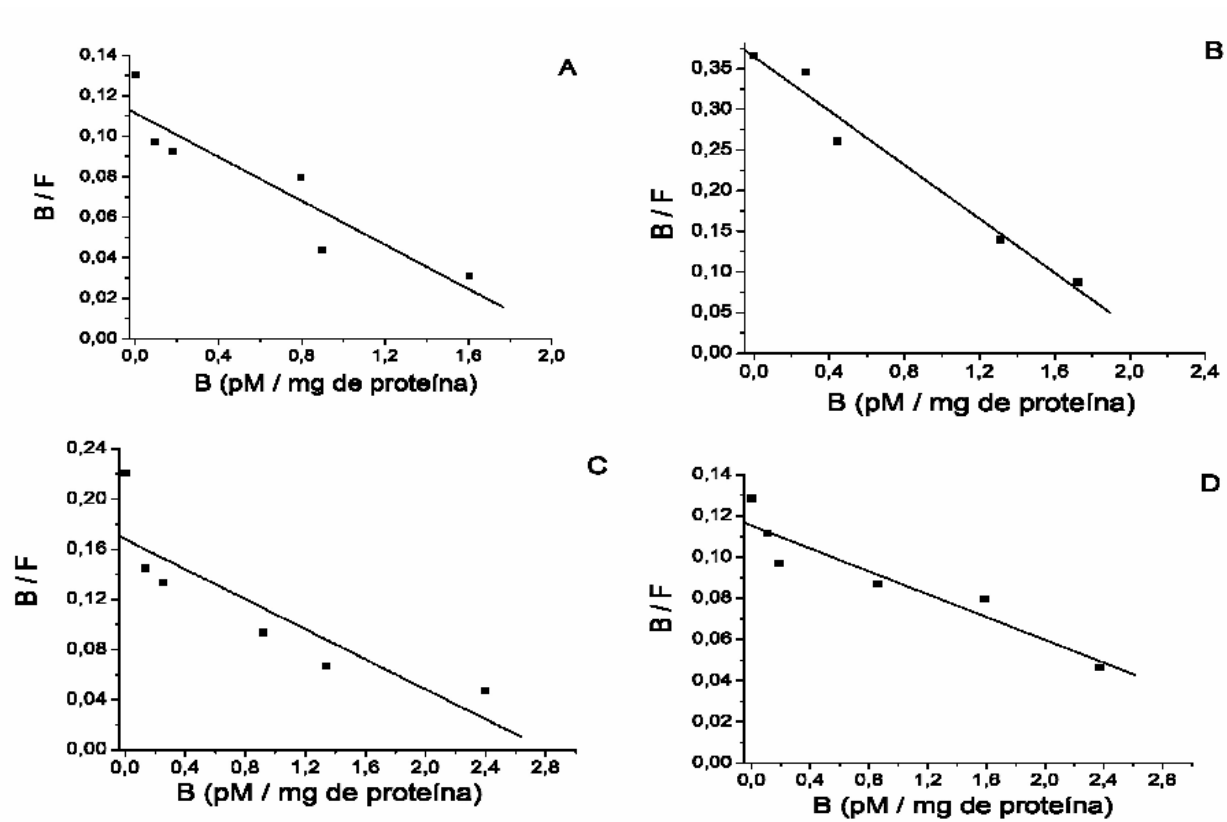
A análise de Scatchard frente a um sistema homogêneo de receptores, como observado para o receptor de insulina de invertebrados, leva a um gráfico representado por uma reta. A partir de uma análise matemática desse gráfico é possível obter-se os valores de  $K_d$  e de  $B_{\max}$  de uma população de receptores. O  $K_d$  relaciona-se inversamente a afinidade do receptor ao hormônio, enquanto o  $B_{\max}$  indica a concentração de receptores presentes num sistema. Neste trabalho os gráficos de Scatchard são retilíneos (com algumas exceções discutidas posteriormente), característicos para receptores hormonais (hormônio hiperglicemiante, outras *insulin-like*) de invertebrados. A observação dos gráficos das figuras 17 a 19 sugere uma relação de afinidades similar à verificada nas curvas de competição (Figuras 14 a 16).



**Figura 17:** Análise de Scatchard da ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina em brânquias posteriores de *N.granulata*: comparação sazonal. Cada ponto representa a média de duas preparações de membrana em duplicata. **A-** Inverno; **B-** Primavera; **C-** Verão e **D-** Outono.



**Figura 18:** Análise de Scatchard da ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina em brânquias anteriores de *N.granulata*: comparação sazonal. Cada ponto representa uma preparação de membrana em duplicata. **A-** Inverno; **B-** Primavera; **C-** Verão e **D-** Outono.



**Figura 19:** Análise de Scatchard da ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina em músculo mandibular de *N. granulata*: comparação sazonal. Cada ponto representa uma preparação de membrana em duplicata. **A-** Inverno; **B-** Primavera; **C-** Verão e **D-** Outono.

---

Em relação às brânquias posteriores a resolução dos gráficos de Scatchard estabelece no inverno uma constante de dissociação ( $K_d$ ) significativamente ( $p \leq 0,05$ ) reduzida em relação a primavera, ao verão e ao outono (Tab.6). Já a concentração de receptores ( $B_{max}$ ) teve aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) apenas no verão (Tab.7).

Quanto às brânquias anteriores também a constante de dissociação ( $K_d$ ) foi, significativamente ( $p \leq 0,05$ ) menor no inverno, em relação a primavera (Tab.6). Além disso, no inverno o  $K_d$  foi 60% menor ( $p > 0,05$ ) comparado ao verão e ao outono (Tab.6). Quanto a concentração de receptores ( $B_{max}$ ) no verão houve um aumento de, aproximadamente, 5 vezes ( $p \leq 0,05$ ) em relação ao inverno, a primavera e ao outono (Tab.7).

A análise das características sazonais de  $K_d$  no tecido muscular mostrou uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) deste parâmetro no verão, no inverno e na primavera, respectivamente, comparado ao outono (Tab.6). Já a concentração de receptores não apresentou alterações significativas entre as estações (Tab.7).

As tabelas 6 e 7 apresentam as diferenças teciduais das características de  $K_d$  e de  $B_{max}$  em *N.granulata*. O tecido branquial anterior tem a menor ( $p \leq 0,05$ ) constante de dissociação ( $K_d$ ) quando comparado aos tecidos branquial posterior e muscular (Tab.6). Os resultados de ligação da  $^{125}\text{I}$ - insulina demonstram a presença de sítios de ligação à substância similar à insulina nos tecidos branquial e muscular de *N.granulata*, com significativa variação sazonal.

Para examinar os efeitos das variações de osmolalidade da hemolinfa sobre a afinidade dos receptores a insulina foi realizada a análise de correlação de *Pearson*. Nas brânquias posteriores a osmolalidade da hemolinfa mostrou uma correlação positiva significativa em todas as estações (Tab.8).

**Tabela 6:** Características Sazonais da Constante de Dissociação-  $K_d$  (pM) em Brânquias Posteriores (BP), Brânquias Anteriores (BA) e Músculo Mandibular de *N.granulata*.

	Estações do Ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<b>BP</b>	8,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	16 ± 1,7	12 ± 3,36	12 ± 4,3
<b>BA</b>	3 ± 0,94 <sup>b,*</sup>	7,2 ± 2,5 <sup>*</sup>	5,7 ± 3,3 <sup>*</sup>	5 ± 0,86 <sup>*</sup>
<b>MM</b>	12,25 ± 6,4	19,5 ± 8,6	11,35 ± 6,1	34,5 ± 0,57 <sup>c</sup>

\*  $p \leq 0,05$  em comparação as brânquias posteriores e ao músculo mandibular.

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  em comparação a primavera, ao verão e ao outono.

<sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  em comparação a primavera.

<sup>c</sup>  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, ao verão e a primavera.

N= 4 (MM) a 6 (BP e BA) preparações de membrana em duplicata com 15 animais cada.

Coeficiente R = 0,90 a 0,99

**Tabela 7:** Características Sazonais da Capacidade Máxima de Ligação-  $B_{max}$  (pM / mg de proteína) em Brânquias Posteriores (BP), Brânquias Anteriores (BA) e Músculo Mandibular de *N.granulata*.

	Estações do Ano			
	Inverno	Primavera	Verão	Outono
<b>BP</b>	0,71 ± 0,3	1,35 ± 0,4	2,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,2
<b>BA</b>	0,61 ± 0,15	0,69 ± 0,18	3,4 ± 1,1 <sup>a,**</sup>	0,47 ± 0,34
<b>MM</b>	1,9 ± 0,11 <sup>*</sup>	2,5 ± 1,4 <sup>*</sup>	2 ± 0,9	3,5 ± 0,6 <sup>b,*</sup>

\*  $p \leq 0,05$  em comparação as brânquias posteriores e anteriores.

\*\*  $p \leq 0,05$  em comparação as brânquias posteriores e ao músculo mandibular.

<sup>a</sup>  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, a primavera e ao outono.

<sup>b</sup>  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, a primavera e ao verão.

N= 4 (MM) a 6 (BP e BA) preparações de membrana em duplicata com 15 animais cada.

Coeficiente R = 0,90 a 0,99

**Tabela 8:** Correlação entre a osmolalidade da hemolinfa e a constante de dissociação- $K_d$  para insulina, em brânquias posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e músculo mandibular (MM) de *N.granulata*.

	Inverno		Primavera		Verão		Outono	
	R	p	R	p	R	p	R	p
<b>BP</b>	1	0,001	1	0,001	1	0,001	1	0,001
<b>BA</b>	1	0,05	1	0,001	-1	0,001	-1	0,001
<b>MM</b>	1	0,001	-1	0,001	1	0,001	1	0,001

R= coeficiente de correlação

p= indica o grau de significância

#### 4. Atividade Tirosina Quinase do CGIRLTK: alteração sazonal

As figuras 20 a 22 mostram os resultados dos experimentos que avaliaram a sazonalidade da atividade tirosina quinase do receptor insulínico do *N. granulata*. Nas brânquias posteriores a insulina aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a incorporação de  $[\gamma \text{ }^{32}\text{P}]$  ATP ao substrato exógeno Poly (Glu,Tyr) 4:1 no inverno e no verão (Fig.20). Além disso, a atividade tirosina quinase apresentou uma inibição de 36% ( $p > 0,05$ ), em relação ao grupo controle (albumina), quando a genisteína (500  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada ao meio de incubação (Fig. 20).

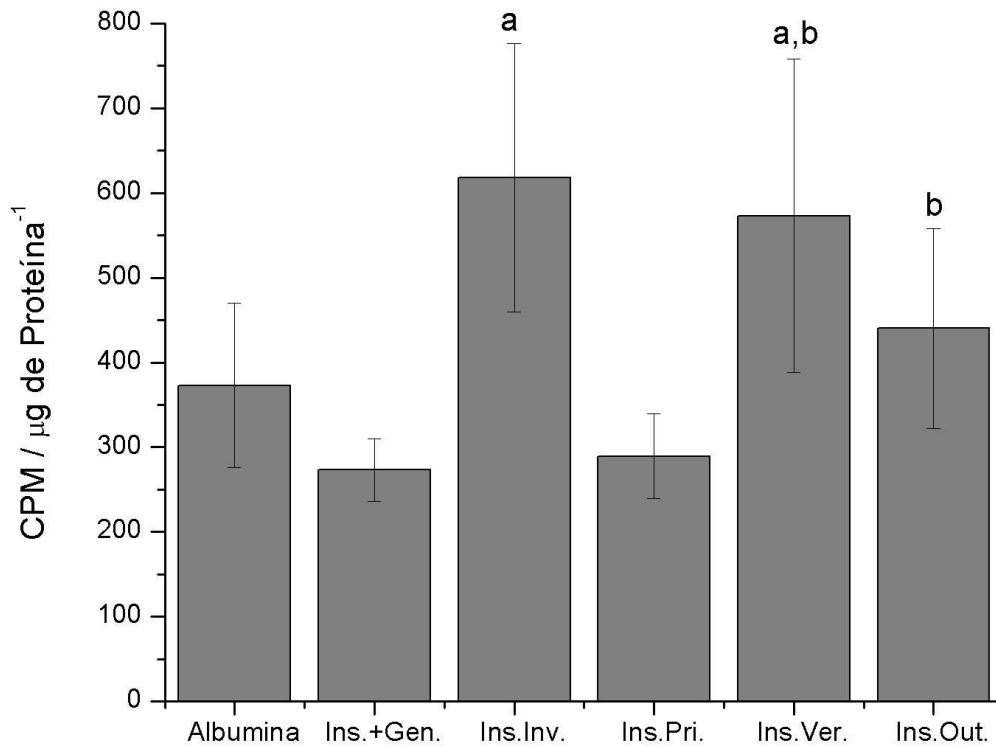
Nas brânquias anteriores a presença de insulina no meio de incubação estimulou, em 52% e 35 % ( $p \leq 0,05$ ), a atividade tirosina quinase no verão e no inverno, respectivamente (Fig. 21). Neste tecido, a genisteína reduziu em 75 % a incorporação de  $[\gamma \text{ }^{32}\text{P}]$  ATP ao substrato exógeno Poly (Glu,Tyr) 4:1 quando comparada ao grupo controle (Fig. 21).

---

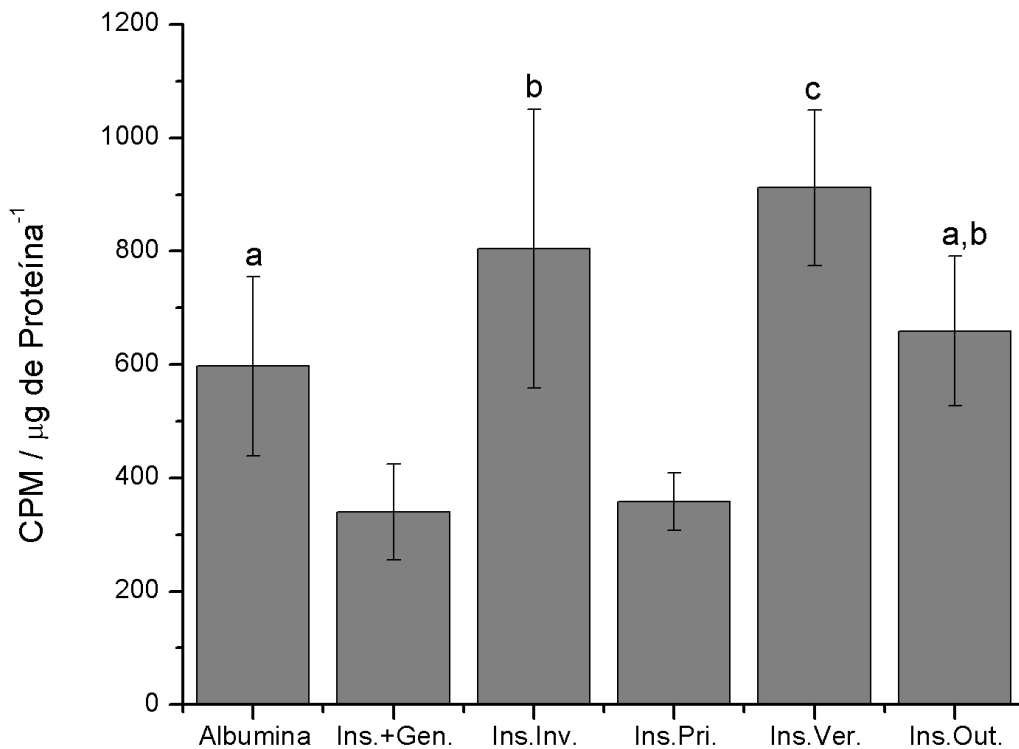
No tecido muscular a genisteína também foi capaz de inibir, significativamente, a incorporação de [ $\gamma$   $^{32}$ P] ATP ao substrato exógeno Poly (Glu,Tyr) 4:1 (Fig. 22). Além disso, no verão a insulina estimulou, significativamente, ( $p \leq 0,05$ ) a atividade tirosina quinase do receptor insulínico (Fig.22). Este estímulo foi de, aproximadamente, 200% em relação ao controle, ao inverno e a primavera (Fig. 22).

A avaliação dos efeitos da variação da osmolalidade hemolinfática sobre a transdução do sinal insulínico mostrou uma correlação significativa ( $p \leq 0,001$ ) para todos os tecidos no inverno, na primavera e no verão (Tab.9).

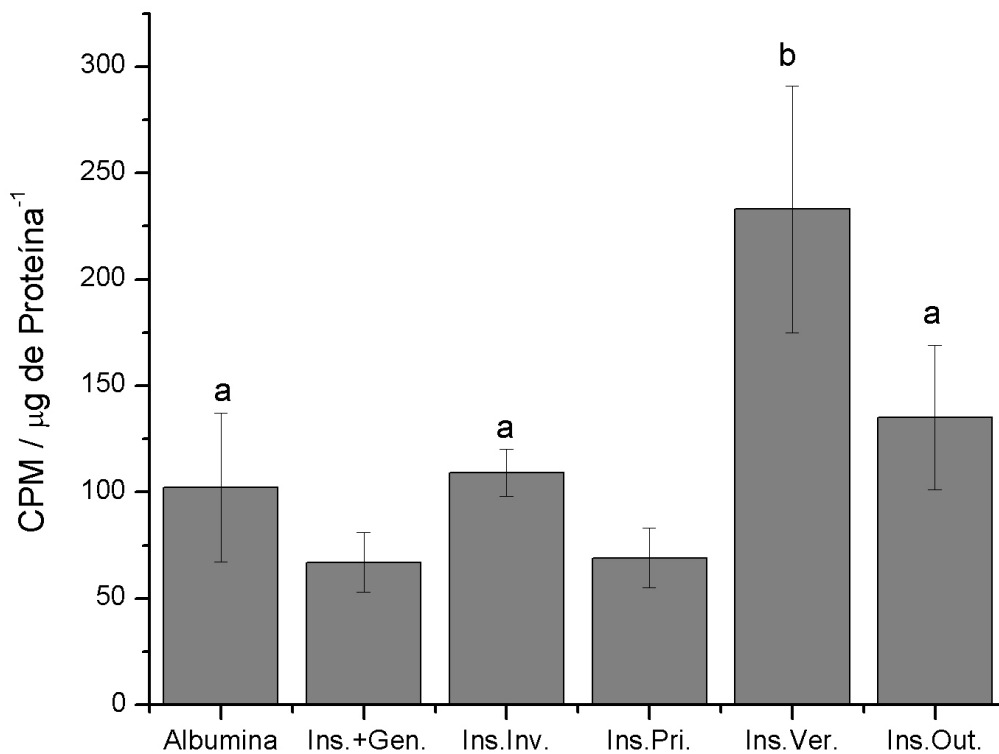




**Figura 20:** Sazonalidade da fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1 em preparações de membrana plasmática de brânquias posteriores de *Neohelice granulata*. Valores de fosforilação de 1mM do substrato Poly (Glu, Tyr) 4:1 na presença de albumina 100nM (basal), de insulina 200nM e genisteína 500  $\mu\text{M}$  (inibidor tirosina quinase) e de insulina 200nM nas quatro estações do ano. Resultados expressos em CPM/  $\mu\text{g}$  de proteína como média  $\pm$  DP. **a** indica ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos grupos albumina, Ins.+ Gen., Ins.Pri. e Ins.Out. **b** indica ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos grupos albumina, Ins.+ Gen., Ins.Inv. e Ins.Pri.. No grupo insulina e genisteína foram utilizadas 14 preparações de membrana em duplicata com 10-15 animais cada, nos demais grupos de 6 a 8 preparações.



**Figura 21:** Sazonalidade da fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1 em preparações de membrana plasmática de brânquias anteriores de *Neohelice granulata*. Valores de fosforilação de 1mM do substrato Poly (Glu, Tyr) 4:1 na presença de albumina 100nM (basal), de insulina 200nM e genisteína 500  $\mu\text{M}$  (inibidor tirosina quinase) e de insulina 200nM nas quatro estações do ano. Resultados expressos em CPM/  $\mu\text{g}$  de proteína como média  $\pm$  DP. **a** ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos grupos Ins.+ Gen., Ins.Inv., Ins.Pri. e Ins.Ver.. **b** ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos grupos albumina, Ins.+ Gen., Ins.Pri. e Ins.Ver.. **c** ( $p \leq 0,05$ ) em comparação a todos os demais grupos. No grupo insulina e genisteína foram utilizadas 15 preparações de membrana em duplicata com 10-15 animais cada, nos demais grupos de 6 a 8 preparações.



**Figura 22:** Sazonalidade da fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) 4:1 em preparações de membrana plasmática de músculo mandibular de *Neohelice granulata*. Valores de fosforilação de 1mM do substrato Poly (Glu, Tyr) 4:1 na presença de albumina 100nM (basal), de insulina 200nM e genisteína 500 μM (inibidor tirosina quinase) e de insulina 200nM nas quatro estações do ano. Resultados expressos em CPM/ μg de proteína como média ± DP. **a** ( $p \leq 0,05$ ) em comparação aos grupos Ins.+ Gen., Ins.Pri. e Ins.Ver.. **b** ( $p \leq 0,05$ ) em comparação a todos os demais grupos. No grupo insulina e genisteína foram utilizadas 15 preparações de membrana em duplicata com 10-15 animais cada, nos demais grupos de 6 a 8 preparações.

**Tabela 9:** Correlação entre a osmolalidade da hemolinfa e a fosforilação do substrato sintético Poly (Glu, Tyr) posteriores (BP), brânquias anteriores (BA) e músculo mandibular (MM) de *N.granulata*

	Inverno		Primavera		Verão		Outono	
	R	p	R	p	R	p	R	p
<b>BP</b>	1	0,001	1	0,001	1	0,001	0,964	0,172
<b>BA</b>	1	0,05	1	0,001	-1	0,001	0,997	0,05
<b>MM</b>	1	0,001	1	0,001	0,5	0,665	0,996	0,05

R= coeficiente de correlação

p= indica o grau de significância

### 5 Captação de Glicose, Glicemia e Captação de Aminoácidos Neutros em *N.granulata*: sazonalidade

A figura 23 mostra que os valores de captação de DG nas brânquias posteriores foram significativamente maiores do que aqueles verificados com MG nas quatro estações, chegando a valores 2 vezes maiores no inverno e no verão.

A captação de DG em brânquias posteriores começa a aumentar no inverno e na primavera alcançando valores máximos no verão ( $p \leq 0,05$ ). Em brânquias posteriores a captação de MG foi significativamente maior na primavera e no verão, diminuindo no outono e no inverno (Fig.23).

Nas brânquias anteriores a captação de DG foi, significativamente, superior aquela de MG no inverno, no verão e no outono. Além disso, no verão ocorreu um aumento na captação de DG ( $p \leq 0,05$ ) em relação às demais estações do ano. Já a captação de MG aumentou apenas na primavera ( $p \leq 0,05$ ), no inverno, no verão e no outono os valores de captação de MG foram similares (Fig. 24).

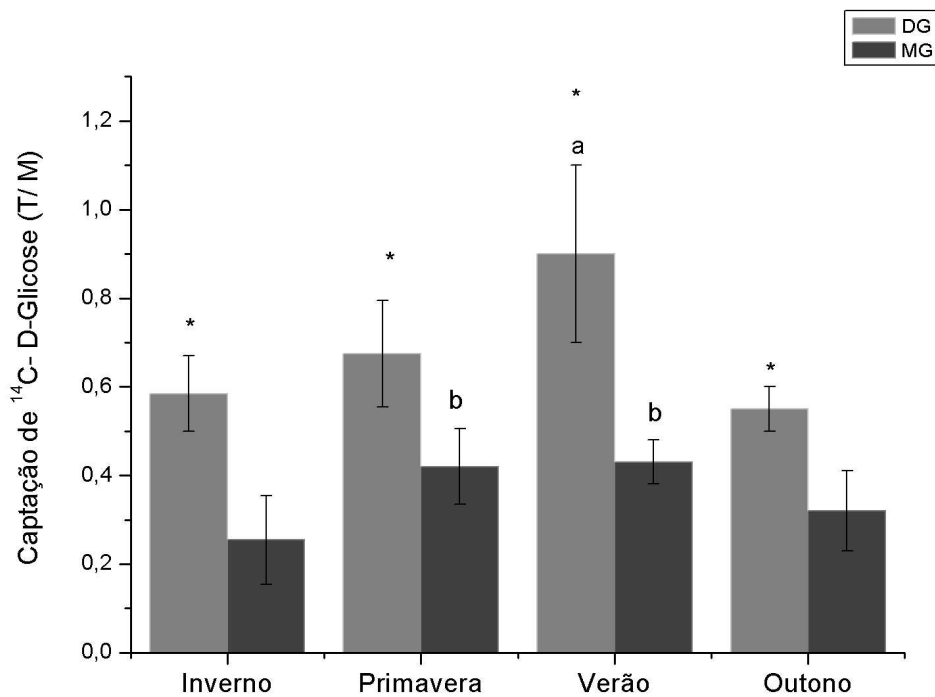
No músculo mandibular a captação de DG foi superior ( $p \leq 0,05$ ) a MG no outono (Fig.25), entretanto, no inverno e na primavera a captação de MG foi, aproximadamente, 17% superior ( $p > 0,05$ ) aquela de DG (Fig.25). Nas estações de

---

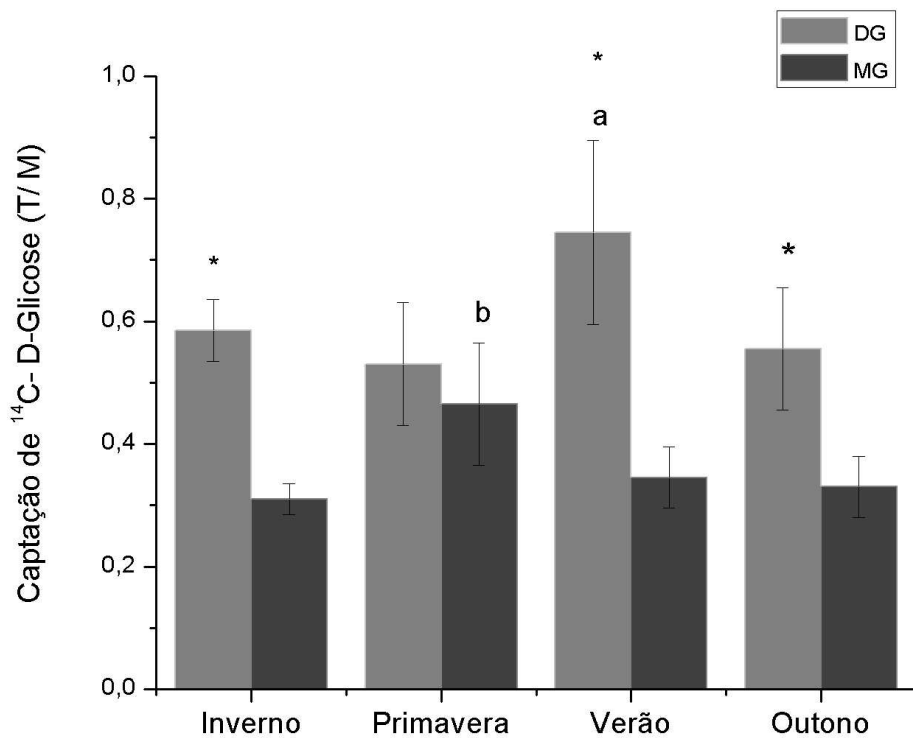
primavera e de outono evidencia-se um aumento ( $p \leq 0,05$ ) na captação de DG comparado ao inverno e ao verão (Fig. 25). A captação de MG na primavera e no inverno apresenta os maiores ( $p \leq 0,05$ ) valores de T/M em comparação as estações de verão e outono (Fig.25).

A Figura 26 mostra a diferença sazonal da concentração de glicose na hemolinfa de *N. granulata*, sendo 64 % e 39% ( $p \leq 0,05$ ) mais elevada no verão em relação à primavera e ao outono e inverno, respectivamente.

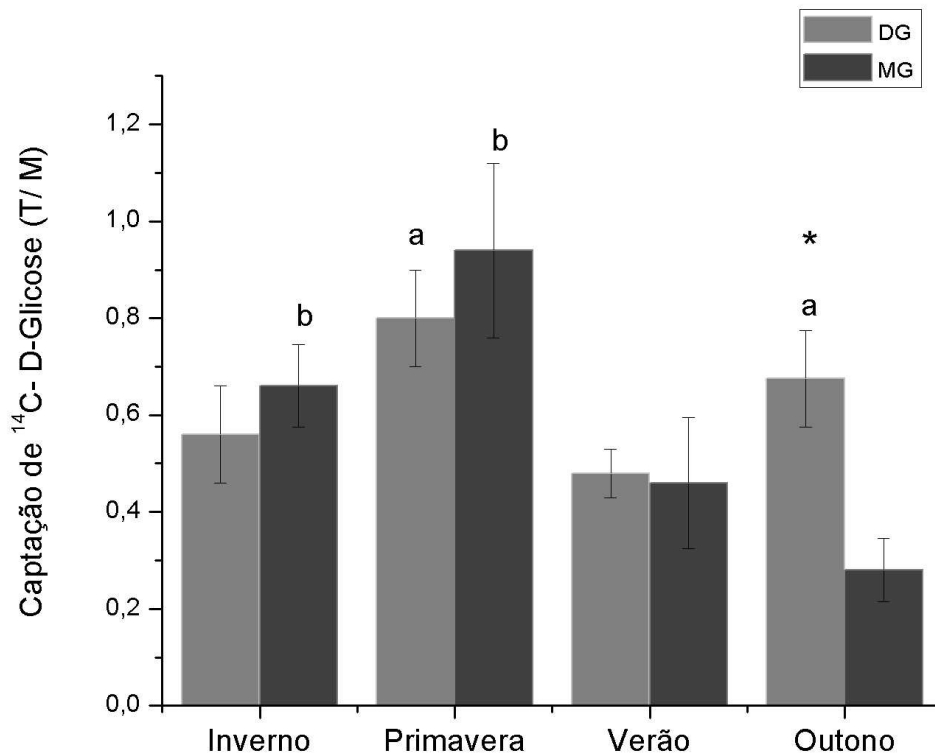
Verifica-se que a sazonalidade modificou a captação do análogo MeAIB nas brânquias posteriores, brânquias anteriores e músculo mandibular. Nas brânquias posteriores e anteriores a captação de MeAIB aumentou significativamente ( $p \leq 0,05$ ), somente no outono, nas demais estações os valores de captação são similares (Fig. 27 A e B). Já no músculo mandibular, a captação de MeAIB foi 50% menor ( $p \leq 0,05$ ) no outono e no inverno em relação a primavera (Fig.27 C).



**Figura 23:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxi-D-glicose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] metil-D-glicose (MG) em brânquias posteriores de *N.granulata*. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n= 8-10 caranguejos. \*  $p \leq 0,05$  em comparação a MG. **a**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, a primavera e ao outono. **b**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno e ao outono.

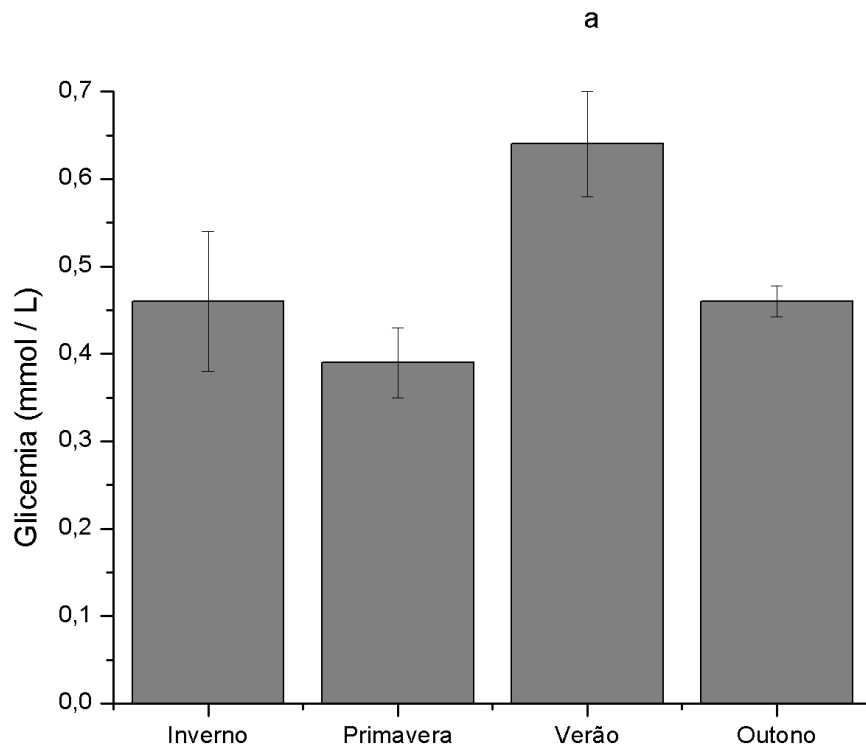


**Figura 24:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxi-D-glicose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] metil-D-glicose (MG) em brânquias anteriores de *N.granulata*. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n= 8-10 caranguejos. \*  $p \leq 0,05$  em comparação a MG. **a**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, a primavera e ao outono. **b**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, ao verão e ao outono.

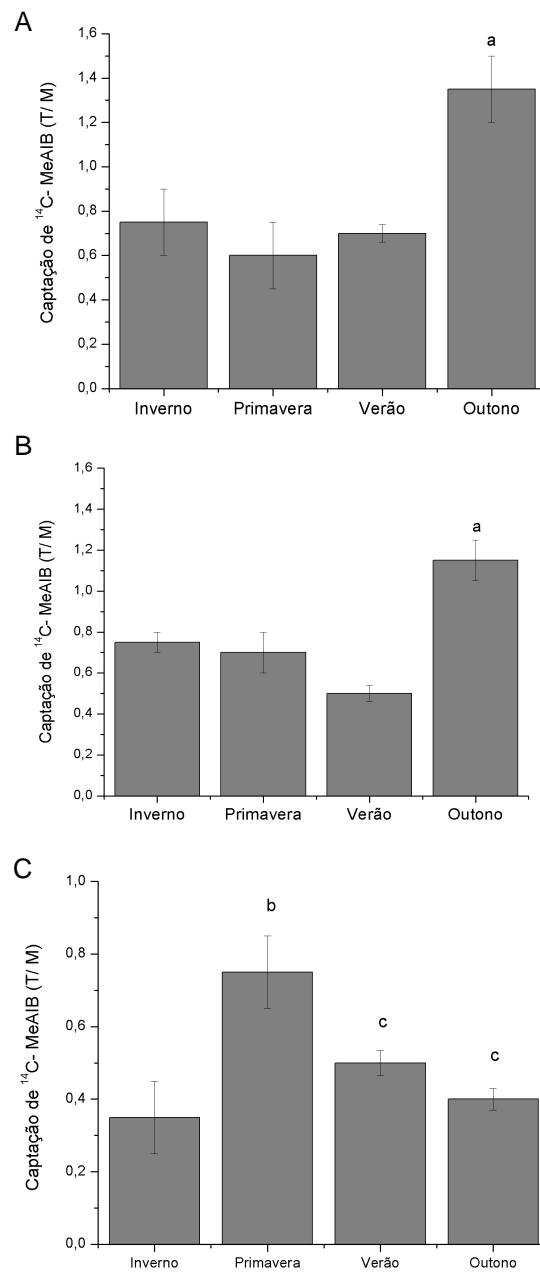


**Figura 25:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxi-D-glicose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] metil-D-glicose (MG) em músculo mandibular (MM) de *N.granulata*. Resultados expressos como média ± desvio padrão, n= 8-10 caranguejos. \*  $p \leq 0,05$  em comparação a MG. **a**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno e verão. **b**  $p \leq 0,05$  em comparação ao verão e outono.





**Figura 26:** Efeito da sazonalidade sobre a concentração de glicose na hemolinfa de *N.granulata*. Resultados expressos como média (colunas)  $\pm$  desvio padrão (barras verticais), o número de animais variou de 5 -7. **a**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, a primavera e ao outono.



**Figura 27:** Efeito da sazonalidade sobre a captação de [ $^{14}\text{C}$ ]-MeAIB em brânquias posteriores (**A**), brânquias anteriores (**B**) e músculo mandibular (**C**) de *N.granulata*. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, n=6-10 caranguejos. **a**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, primavera e verão. **b**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno, verão e outono. **c**  $p \leq 0,05$  em comparação ao inverno e primavera.

# DISCUSSÃO

---

Em seu habitat os crustáceos eurialinos são anualmente expostos a diversas condições estressantes a exemplo das variações de salinidade da água, pressão parcial de oxigênio, temperatura, pH, fotoperíodo e disponibilidade de alimentos (Kucharski e Da Silva, 1991b; Bromberg, 1992; Vinagre e cols., 2007; Oliveira e cols., 2007). Assim, as espécies que vivem em pântanos e marismas têm despertado o interesse em relação às estratégias bioquímicas e fisiológicas utilizadas durante a adaptação a diferentes tipos de injúria que anualmente estão sujeitas. Distintas pesquisas em crustáceos buscam elucidar o envolvimento de hormônios, da interação hormônio-receptor, dos eventos pós-receptores, bem como, de vias metabólicas e suas enzimas chave com diferentes tipos de estresse salino, iônico, hipóxia, anóxia, jejum, realimentação, composição da dieta, etc. (Eckhardt e cols., 1995; Kucharski e cols., 1999; Schein e cols., 2003; Serrano e cols., 2003; Pellegrino e cols., 2008). Na sua maioria essas pesquisas têm, com exceção das variáveis de interesse, todas as demais condições experimentais controladas. Já pesquisas direcionadas a identificação de aspectos fisiológicos e suas possíveis relações com simultâneos fatores ambientais estressantes são pouco exploradas e, embora impliquem em árdua tarefa experimental, são cruciais para a compreensão bio-ecológica das espécies que vivem em áreas estuarinas e intertidais.

Neste trabalho as variações sazonais de alguns parâmetros do ambiente estuarino são correlacionadas com as alterações das características do receptor *insulin-like*, com a ativação da transdução do sinal insulínico e com a captação de glicose e de aminoácidos neutros em brânquias anteriores e posteriores e músculo de *N.granulata*, coletados diretamente no ambiente estuarino.

Dentre os ritmos biológicos, o ciclo-anual está presente em diferentes espécies de invertebrados e de vertebrados não mamíferos e mamíferos (Underwood e cols., 1997; Bradshaw e Holzapfel., 2007b). Esse ritmo pode ser considerado uma aquisição recente na evolução dos seres vivos, emergindo junto a organismos com ciclos de

vida iguais ou superiores a um ano (Underwood e cols., 1997). Embora sua presença tenha sido descrita em mais de 200 espécies animais, o ritmo ciclo-anual é pouco investigado e não são conhecidos quais os mecanismos e substâncias químicas estão envolvidas no reconhecimento e na determinação das alterações biológicas características de cada estação (Underwood e cols., 1997; Bradshaw e Holzapfel., 2007a; 2007b; Piggins e Meijer, 2007). Por outro lado, estudos com invertebrados e vertebrados indicam que mudanças sazonais nas condições ambientais alteram o ritmo ciclo-anual endógeno com efeitos sobre a fisiologia e o comportamento de diversas espécies.

O presente estudo mostra que as alterações sazonais de salinidade da água são um dos principais fatores estressantes do ambiente natural do *N.granulata*. Crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: (1) regulação anisomótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolaridade da hemolinfa independente da osmolaridade do meio externo; (2) regulação isomótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolaridade do fluido intracelular e do volume celular, com o objetivo de mantê-lo isomótico em relação ao fluido extracelular. A regulação isomótica do fluido intracelular implica em: (1) respostas imediatas de alteração do volume celular, como consequência de choques osmóticos e envolve a plasticidade da membrana plasmática; (2) eventos de influxo e efluxo de efetores osmóticos, tanto orgânicos (aminoácidos livres) como inorgânicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$ ) (Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997).

Organismos que vivem em condições osmoticamente instáveis como solo e regiões estuarinas e intertidais, assim como células intestinais e medulares do rim são regularmente expostos a grandes flutuações de osmolaridade extracelular e desenvolveram uma eficaz e eficiente capacidade de manter o equilíbrio osmótico e de reparar danos celulares causados por condições estressantes (Lamitina e Strange, 2004). Trabalhos realizados com hepatócitos de mamíferos mostram alguns efeitos da

variação da concentração do meio extracelular sobre o volume celular. Células subitamente submetidas ao meio hiposmótico incham e, dentro de minutos, retornaram parcialmente ao seu volume original. Esse comportamento foi denominado Regulação da redução do volume celular (*regulatory cell volume decrease* - RVD). Inversamente, a exposição súbita ao meio hiperosmótico leva a uma redução do volume celular e, após poucos minutos, ocorre Regulação do aumento do volume celular (*volume regulatory increase* – RVI), retornando o volume aos níveis iniciais. Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou RVI podem diferir entre diferentes tipos celulares, mas em geral envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons e solutos orgânicos na membrana plasmática (Häussinger e cols., 1994; Wehner e cols., 2004). Em hepatócitos de ratos o RVD é obtido pelo transporte na membrana celular de  $K^+$ ,  $Cl^-$  e  $HCO_3^-$ , o aumento do volume celular leva a ativação de canais iônicos e canais de cátions não seletivos ativados por estiramento. Quanto ao RVI o aumento súbito da osmolaridade extracelular leva a ativação de trocadores  $Na^+-H^+$  e  $Cl^-HCO_3^-$  na membrana plasmática e a ativação de canais de  $K^+$ -ouabaína e amiloride sensíveis. Os mecanismos envolvidos no RVD e RVI não restabelecem completamente os volumes celulares e as células permanecem levemente murchas ou levemente entumecidas. Foi proposto que esta pequena variação de volume atue como sinal para as modificações celulares, contudo os sinais e as vias de sinalização pelas quais as células detectam mudanças no volume celular e ativam os mecanismos de ajuste osmótico são pouco conhecidos (Wehner e cols., 2004).

### **1. Receptor *Insulin-Like* em *Neohelice granulata*: sazonalidade**

A insulina e as vias de sinalização ativadas pelo hormônio têm sido implicadas nos processos de ajuste osmótico presentes de nematódeos a mamíferos (Lamitina e Strange, 2004; Ouwens e cols., 2001; Gual e cols., 2003a; Gual e cols., 2003b). A insulina e o choque hiposmótico causam aumento do volume celular e há registro que

várias proteínas da via de sinalização da insulina ou do IGF-I, como a PI3-K, MAPquinases e Jun-NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) ou quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK-1 e 2), são ativadas pelo hormônio e por condições hiposmóticas do meio (Ouwens e cols., 2001). Já o choque hiperosmótico em mamíferos causa aumento da via de sinalização da insulina em células musculares e ovarianas (Ouwens e cols., 2001; Gual e cols., 2003a) e resistência à insulina em adipócitos (Gual e cols., 2003b). No nematódeo *C.elegans* a inibição da atividade do receptor (DAF-2) ou da PI3-quinase AGE-1 aumenta a resistência ao estresse hiperosmótico através da ativação de DAF-16, entretanto, essa proteína não é o principal componente na adaptação ao estresse osmótico (Lamitina e Strange, 2004). Em *C.elegans* a redução na atividade da via de sinalização *insulin/IGF I-like* causa aumento no ciclo de vida e na resistência ao estresse térmico e hipóxico. Esses mecanismos parecem ser evolutivamente conservados já que em *Drosófila* e camundongos uma redução na atividade da via de sinalização *insulin/IGF I-like* causa aumento no ciclo de vida e na resistência ao estresse oxidativo (Lamitina e Strange, 2004).

No caranguejo *N.granulata* não foi identificada uma molécula similar à insulina, apesar disso a insulina bovina estimulou a captação de glicose, a síntese de glicogênio e a atividade da bomba Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase nas brânquias deste crustáceo (Kucharski e cols, 2002, Martins, 2002). Já a via de sinalização *insulin/IGF I-like* tem sido estudada em *N.granulata* desde 1997, quando Kucharski demonstrou a presença de sítios receptores à insulina, a auto-fosforilação da subunidade β e a atividade tirosina quinase do receptor presente em brânquias. Trabalhos posteriores mostraram que a transdução do sinal insulínico foi modulada, diferentemente, por fatores externos como a composição da dieta (rica em carboidratos ou rica em proteínas) e pelo o tipo de estresse salino (hipo ou hiperosmótico) (Trapp e cols., 2000; Trapp, 2005). Em 2002, foi realizada a clonagem parcial do gene CGIRLTK- *Chasmagnathus*

---

*granulata* insulin receptor-like tyrosine kinase (*GenBank* DQ104241) presente nas brânquias posteriores de *N.granulata*.

No presente trabalho mostrou-se, pela primeira vez, o efeito da sazonalidade sobre a expressão do gene *CGIRLTK* em tecidos com diferentes características morfológicas e funcionais, como por exemplo, as brânquias posteriores, anteriores e o músculo mandibular de *N.granulata*. Já em 1997, Kucharski e cols., demonstraram, após a injeção de  $^{125}\text{I}$ -insulina, que os tecidos branquial, hepatopancreático e cardíaco de *N.granulata* eram capazes de captar a radioatividade oferecida, indicando a presença de sítios de ligação à insulina nesses tecidos. O complexo de sinalização insulina-receptor representa um dos mais antigos e mais bem conservados sistemas de sinalização no controle do crescimento de metazoários e está relacionado ao crescimento e à proliferação celular, assim como na regulação do envelhecimento, do metabolismo energético e da fertilidade (Wu e Brown, 2006; Luckhart e Riehle, 2007). A presença de receptores tirosina quinase em brânquias e músculo é mais um indicativo da existência de uma proteína *insulin-like* e seu envolvimento em diferentes funções celulares no *N.granulata*. Além disso, a região tirosina quinase (TK) dos receptores *insulin/IGF I-like* em cnidários, esponjas, vermes, moluscos, insetos e crustáceos tem elevada homologia com a região TK do receptor de vertebrados e mostra-se altamente conservada entre as espécies animais (Chan e Steiner, 2000; Leibush e Chityakova, 2003). Em mamíferos o receptor de insulina é encontrado em todos os tipos celulares, entretanto existe apenas um gene do receptor o qual pode originar duas isoformas da proteína (Claeys e cols. 2002). Na mosca *D. melanogaster* foram caracterizadas duas isoformas do receptor *insulin/IGF I-like*, sendo que uma é estruturalmente similar aos receptores de insulina e IGF-I de vertebrados. Já a outra isoforma do receptor apresenta uma extensão citoplasmática do domínio C terminal que pode ser funcionalmente relacionada ao substrato do receptor de insulina -1 (Ruan e cols., 1995; Wo e Brown; 2006). A distribuição tecidual dos receptores de *D.melanogaster* não está definida, mas a expressão da proteína ocorre de maneira



ubíqua na embriogênese, após esta fase os receptores são expressos no sistema nervoso de machos e de fêmeas e em ovários. No mosquito *Aedes aegypti* o receptor tirosina quinase (MIR) é uma proteína de, aproximadamente, 400 kDa com duas subunidades  $\alpha$  e duas  $\beta$ . A expressão do MIR, constatada inicialmente em ovários de *A. aegypti*, também ocorre na cabeça e na parede corporal do mosquito da febre amarela (Roy e cols., 2007). Já no verme *C.elegans* apenas uma proteína DAF-2 é expressa em células neuro-secretoras e, similarmente a *drosófila*, apresenta uma extensão do domínio C terminal que funciona como uma proteína IRS-1 (substrato do receptor de insulina- 1) (Kimura e cols. 1997; Wu e Brown; 2006).

Além de indicar uma ampla distribuição tecidual do receptor *insulin/IGF I-like* em *N.granulata* este estudo mostrou o marcante efeito da sazonalidade sobre a concentração de mRNA do gene CGIRLTK. No inverno a expressão do CGIRLTK presente nas brânquias posteriores foi 35% superior àquela verificada na primavera e no outono e 15% mais elevada em relação ao verão. No verão também se observa um aumento de 17% nos níveis de mRNA do CGIRLTK em relação a primavera e ao outono (Fig.8). Contudo, a sazonalidade não afetou a concentração de mRNA do CGIRLTK em brânquias anteriores. Como as brânquias anteriores estão relacionadas à função respiratória e excretória de amônia no *N.granulata*, uma alteração sazonal na concentração de mRNA do CGIRLTK teria reflexos na homeostase desse animal. Durante a aclimação à salinidade extrema aumenta o consumo de oxigênio o que levaria ao aumento da atividade de transporte de gases e da excreção ativa de amônia pelas brânquias anteriores (Bianchini e Castilho, 1999; Bianchini e cols., 2008). Entretanto, a função de um receptor *insulin-like* em brânquias anteriores necessita de maior investigação. Kucharski e cols. (2002) não constataram efeito da insulina sobre a captação de glicose e a síntese de glicogênio em brânquias anteriores de *N.granulata*. Já no músculo mandibular a concentração de mRNA aumentou, aproximadamente, 70% na primavera em comparação as demais estações (Fig.12).

---

Experimentos com animais coletados diretamente em seu ambiente natural estão sujeitos à interferência de inúmeros fatores sobre as variáveis analisadas. Assim, torna-se difícil a identificação e o isolamento de fatores correlacionados com os resultados observados. Contudo, acredita-se que a extrema variação sazonal de salinidade da água e seu impacto sobre a osmolalidade da hemolinfa tenham influenciado o efeito sazonal da expressão do receptor *insulin-like* nas brânquias posteriores e no músculo de *N.granulata*.

No caranguejo *N.granulata* diversos trabalhos mostram o impacto do estresse osmótico sobre a expressão e a atividade de importantes enzimas envolvidas no metabolismo intermediário durante a aclimação à salinidade do meio (Schein e cols., 2003; Schein e cols., 2005a; Chittó, 2006). Trapp (2005) constatou que o estresse salino pode interferir nas características de ligação e na atividade tirosina quinase do receptor insulínico branquial. Em animais coletados diretamente do estuário o aumento na expressão do gene CGIRLTK nas brânquias posteriores, no inverno e verão, pode ser um dos mecanismos celulares deflagrados em resposta as acentuadas mudanças ambientais de salinidade e de temperatura. Enquanto isso, no tecido muscular o aumento na expressão do CGIRLTK deve estar relacionado a processos metabólicos estratégicos à aclimação as novas condições ambientais.

Quanto a sazonalidade da expressão do gene CGIRLTK é importante salientar que caranguejos *N.granulata* aclimatados as condições de laboratório, sob fotoperíodo natural, salinidade, pH, temperatura e alimentação controlados, igualmente mostram uma variação sazonal na expressão e na atividade da enzima PEPCK-fosfoenolpiruvato carboxiquinase (EC 4.1.1.32) que atua em diferentes vias metabólicas (Schein e cols. 2005a; Chittó, 2006). Assim, pode-se sugerir a existência de um ritmo ciclo-anual endógeno de expressão do gene do CGIRLTK em diferentes tecidos de *N.granulata*.

Trabalhos realizados em vertebrados não mamíferos mostraram que a sazonalidade afeta as características de ligação da insulina ao receptor. Em *Rana*

*esculenta* no verão houve um aumento na ligação específica da  $^{125}\text{I}$ -insulina ao receptor, quando comparada àquela observada no inverno, causada pelo aumento na concentração de receptores (Scapin e Incerpi, 1992). Em *N.granulata* a sazonalidade afetou a ligação específica da  $^{125}\text{I}$ -insulina aos receptores das brânquias posteriores com aumento significativo da ligação nas estações de inverno e de verão (Tab.3). As brânquias posteriores são os principais órgãos osmorreguladores em crustáceos e asseguram a sobrevivência de espécies eurialinas em ambientes de salinidade variável. No inverno observou-se que a osmolalidade da água foi 3,5 vezes menor em relação ao verão e variou 4 vezes (41 → 170 mOsm/Kg de água, percentis 25 e 75%, respectivamente) dentro da própria estação (Tab.2).

No inverno a concentração de insulina não marcada necessária para inibir 50% a ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina foi 3 vezes menor do que no verão ( $^4\text{IC}_{50}$ = 1,2  $\mu\text{M}$  e 3,4  $\mu\text{M}$ , no inverno e no verão, respectivamente) em brânquias posteriores. Além disso, a constante de dissociação ( $K_d$ ) foi menor no inverno (Tab. 6) o que determinou uma elevada afinidade do receptor ao hormônio nesta estação comparada às demais. O aumento da afinidade constatado no inverno é refletido sobre o sistema hormônio/receptor e os efeitos são claramente observados na curva de competição da insulina nas brânquias posteriores de *N.granulata* (Fig.14). Já o aumento na concentração de receptores no verão não alterou a curva de competição da insulina com a  $^{125}\text{I}$ -insulina. Em hepatócitos de rã (*Rana esculenta*) o aumento da concentração de receptores no verão teve efeito sobre a curva de competição, porém a concentração de insulina necessária para inibir 50% à ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina não foi sazonalmente modificada.

Neste estudo foi utilizada  $^{125}\text{I}$ -insulina humana, pois em diversos trabalhos com invertebrados têm sido usada a insulina humana para o estudo dos efeitos sobre o

---

<sup>4</sup> IC<sub>50</sub>- concentração de hormônio livre necessária para inibir em 50% a ligação do hormônio marcado

---

metabolismo de carboidratos. Assim optou-se pela utilização de insulina humana nos experimentos de competição realizados nesta tese.

Um aspecto importante a ser abordado está relacionado às curvas de competição mostradas neste trabalho que, comparadas a outras curvas com preparações de membranas de tecidos de vertebrados, apresentam-se deslocadas para a direita (Sanvitto, 1992). Este fato indica um sistema de menor afinidade, sendo necessária à utilização de elevadas concentrações de insulina humana não marcada para inibir 50% a ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina. Mesmo assim, a insulina humana foi capaz de ligar-se especificamente aos receptores do *N.granulata*. Já a prolactina bovina não foi capaz de competir com a  $^{125}\text{I}$ -insulina indicando a especificidade do sistema em *N. granulata*, como foi anteriormente demonstrado por Kucharski e cols. (1997). Em insetos, diversos peptídeos *insulin-like* (ILPs) foram isolados e purificados, contudo apenas a insulina de mamífero tem sido utilizada para investigar as características de ligação hormônio-receptor. Wu e Brown (2006) relataram que o receptor de insulina em *D.melanogaster* (DIR) liga-se com alto grau de afinidade a insulina humana ( $K_d$  15 nM) e, embora tenham sido isolados sete peptídeos similares à insulina (DILPs 1 a 7), a ligação hormônio-receptor não foi investigada com os DILPs ou ILPs de outros insetos. Em crustáceos, trabalhos prévios mostraram o estímulo da insulina de mamífero sobre a captação de glicose e a síntese de glicogênio em brânquias posteriores indicando a ação deste hormônio neste órgão (Welcomme e Devos, 1994; Richardson e cols., 1995; Kucharski e cols., 2002). Recentemente, Gutiérrez e cols. (2007) verificaram que a insulina humana estimulou a síntese de glicogênio nas brânquias e no hepatopâncreas do camarão *Penaeus vannamei*.

A análise de Scatchard complementou a análise sazonal da cinética de ligação da insulina ao receptor. Para sistemas que possuem um tipo de sítio de ligação com baixa afinidade o gráfico resulta em uma linha reta. Já a não linearidade com a concavidade voltada para cima pode ser explicada de duas formas: *i*) uma classe de receptores com cooperatividade negativa e *ii*) heterogeneidade de sítios receptores

(Scapin e Incerpi, 1992). Para a primeira hipótese foi proposto que a interação sítio a sítio onde, um aumento na fração de receptores ocupados, diminui a afinidade dos demais receptores ao hormônio e aumenta a velocidade de dissociação. Já a existência de mais de um tipo de receptor (heterogeneidade de sítios) determina diferentes características cinéticas com sítios de alta e baixa afinidade (Scapin e Incerpi, 1992). Os gráficos de Scatchard (Fig. 17) mostram a presença de um sítio receptor de baixa afinidade nas brânquias posteriores, corroborando trabalhos anteriores realizados em *N.granulata*. Kucharski e cols. (1997) mostraram neste caranguejo que a competição da insulina bovina aos sítios receptores de branquiais resultou num gráfico de Scatchard linear com valores de  $K_d$  ( $3,11\mu\text{M}$ ), elevados quando comparados àqueles verificados em vertebrados. Em sua revisão, Navarro e cols. (1999) mostraram valores de  $K_d$  encontrados em estudos com receptores de insulina semi-purificados em diversas espécies de vertebrados. Nos músculos de rato, tartaruga e peixe os valores de  $K_d$  foram de 0,63; 0,29 e 0,22 nM, respectivamente. Em invertebrados estudos que utilizam insulina de mamíferos mostram constante de dissociação com valores elevados. Jonas e cols. (1996), estudando os receptores para insulina em preparações de sinaptossomas do molusco *Aplysia californica* encontraram um  $K_d$  de 140nM e no músculo bucal um  $K_d$  de 70 nM. Em *Anodonta Cygnea* o isolamento e a purificação de sete proteínas *insulin-like* (IRP1-7) permitiu a análise das características de ligação hormônio-receptor. Neste molusco as isoformas isoladas ligaram-se com diferentes afinidades aos receptores de fígado de rato, a concentração de hormônio necessária para inibir 50% a capacidade de ligação variou de 17 (IRP4) a 1700 nM (IRP7), dependendo da isoforma testada (Leibush e Chistyakova, 2003) .

A comparação sazonal dos gráficos de Scatchard mostra que no inverno (Fig. 17 A) houve um aumento na concentração de hormônio ligado com redução no índice B/F. Em função da não linearidade verificada no outono (Fig. 17 D) investigou-se a hipótese da presença de dois sítios de ligação nos tecidos de *N.granulata*. A utilização

do software Kell (versão 6) para tratamento dos dados permitiu a análise da presença de um ou dois sítios de ligação. Os cálculos de dois sítios resultaram em elevadas estimativas de erro que variaram de 100 - >1000%. No entanto, quando os resultados foram analisados na perspectiva de um sítio de ligação as estimativas de erro foram de no máximo 40%. Essas constatações e os resultados obtidos em outros experimentos com receptores hormonais de invertebrados levam a conclusão da presença um receptor com um sítio de ligação em tecidos de *N.granulata*.

O gráfico com tendência curvilínea observado nas brânquias posteriores no outono pode ter a interferência de hormônios envolvidos com os processos reprodutivos que também se ligam a receptores do tipo tirosina quinase. No outono o período reprodutivo do *N.granulata* está na fase final. Recentemente, foi descoberto um gene que expressa uma proteína similar à insulina na glândula androgênica do lagostim *C.quadricarinatus* (Manor e cols., 2007). Foi sugerido que essa proteína regula os processos reprodutivos em machos e pode estar presente em concentrações elevadas no período reprodutivo.

No inverno o aumento da afinidade e da atividade tirosina quinase do receptor (Fig. 20) foi acompanhado de significativa elevação na expressão do gene CGIRLTK (Fig. 8) nas brânquias posteriores. A ação da insulina durante a adaptação ao estresse osmótico já foi mostrada em mamíferos, mas há controvérsias sobre a ação do hormônio na regulação do volume celular. Neste trabalho o aumento na afinidade do receptor ao hormônio e na fosforilação do receptor parecem ser as respostas iniciais à redução de salinidade ambiente observada no inverno, quando a osmolalidade da água reduz a 41mOms/kg de H<sub>2</sub>O ( $\cong$  1,5 ‰). Ao mesmo tempo, a necessidade de manter o ajuste osmótico ao longo da estação, possivelmente, determinou o aumento na expressão do gene do receptor. Em brânquias posteriores de *N.granulata* entre 6 e 24 h de choque hiposmótico (30 ‰  $\rightarrow$  2‰) houve um aumento de 50% na concentração de mRNA da sub-unidade  $\alpha$  da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- ATPase, o qual foi mantido

durante quatro dias. Nas brânquias do teleósteo eurialino *Fundulus heteroclitus* ocorre aumento da atividade de várias MAPquinases em resposta ao choque hiposmótico. Esse aumento inicia-se após 1 hora de estresse e é sustentado por 4 semanas (Kültz e Avila, 2001). Em células A6 epiteliais renais de anfíbio, o choque hiposmótico ativa o ERK dentro de minutos (Chiri e cols., 2004). Trapp (2005) verificou que durante 24 e 72 h de exposição a condições ambientais hiposmóticas houve uma diminuição da atividade tirosina quinase do receptor associada a uma queda na afinidade dos receptores. No entanto, em 144h de estresse hiposmótico a insulina voltou a estimular a fosforilação do receptor insulínico indicando uma ação hormonal coordenada em resposta às mudanças no volume celular.

Nas brânquias posteriores os mecanismos de modulação da via *insulin/ IGF I-like* no verão mostraram-se diferentes, quando comparados àqueles verificados no inverno. O aumento na concentração de receptores (Tab. 6) e na fosforilação do substrato exógeno (Fig. 20) ocorreu paralelamente ao aumento da expressão do gene CGIRLTK (Fig.8). No verão, mesmo quando a salinidade ambiente aumentou 3,5 vezes em relação ao inverno (Tab.2) a osmolalidade da água chegou, no máximo, a 582 mOsm/ Kg de H<sub>2</sub>O (aproximadamente, 22 ‰) e nessa situação o *N.granulata* encontrava-se numa faixa de salinidade abaixo de seu ponto isosmótico (30 ‰). Os resultados mostram que as brânquias posteriores, a despeito da elevação de salinidade ambiente, mantiveram-se sensíveis à insulina no verão. É importante observar que em todas as estações os valores de osmolalidade da hemolinfa correlacionaram-se, significativamente, com as modificações na constante de afinidade (K<sub>d</sub>) e na fosforilação do receptor insulínico nas brânquias posteriores (Tab. 8 e 9).

É bem descrito na literatura que o *N.granulata* hiper-regula em meio diluído e hipo-regula em meio concentrado (Onken e cols., 2003; Luquet e cols.,2005). Durante as 48 h iniciais de hipo ou hiper-regulação iônica foram observados nas brânquias posteriores uma atividade mitocondrial elevada e aumento da capacidade

ionorregulatória, já a expressão protéica e a proliferação celular iniciam após esse período (Luquet e cols., 2005).

Em relação aos resultados discutidos até aqui se pode propor que as brânquias posteriores dispõem de respostas fisiológicas coordenadas que são sazonalmente alteradas frente a mudanças de fatores ambientais. O complexo insulina-receptor e a via de sinalização da insulina parecem atuar a curto e a longo a prazo (ativando enzimas e genes) na adaptação as variações de características físico-químicas do estuário durante as estações mais críticas do ano.

A análise sazonal da ligação específica da  $^{125}\text{I}$ -insulina mostrou que o tecido branquial anterior teve elevados percentuais de ligação comparados ao branquial posterior e ao muscular (Fig. 13). Observou-se que as curvas de competição das brânquias posteriores (Fig. 14) e do músculo (Fig. 16) são deslocadas para a direita, enquanto as curvas das brânquias anteriores (Fig.15) são mais deslocadas à esquerda, indicando maior afinidade do complexo hormônio receptor neste tecido. Verificou-se que nas brânquias anteriores a concentração de insulina não marcada necessária para inibir em 50% a ligação da  $^{125}\text{I}$ -insulina foram menores comparadas aos outros dois tecidos. Os valores de inibição foram alterados segundo a estação do ano e mostraram-se, em média, 40% menor no verão quando comparados às outras três estações do ano (IC50= 0,35; 0,5; 0,4; e 0,5  $\mu\text{M}$  no verão; no inverno, na primavera e no outono, respectivamente). No que diz respeito a sazonalidade das características de ligação ( $K_d$  e  $B_{\text{max}}$ ) (Tab. 6 e 7) e fosforilação do receptor tirosina quinase (Fig. 21) as brânquias anteriores tiveram eventos similares àqueles verificados nas brânquias posteriores no inverno e no verão. Entretanto, na primavera, verificou-se uma resistência à insulina nas brânquias anteriores. Nesta estação a afinidade diminui duas vezes em relação ao inverno (primavera  $K_d$ = 7,2 pM e inverno  $K_d$ =3,0 pM), ao mesmo tempo a atividade tirosina quinase do receptor reduziu-se em 50% (Fig.21). Já a expressão do GCIRLTK não mudou durante as estações do ano (Fig. 10).



As brânquias anteriores são os órgãos responsáveis pela respiração em *N. granulata*. Luquet e cols. (2000) mostraram que o epitélio das brânquias anteriores de animais aclimatados a salinidades que variaram entre 12, 34 e 44 ‰ não teve mudanças significativas na estrutura. Contudo, a adaptação aos meios com salinidades diferentes (30‰ → 2‰ ou 30‰ → 45‰) estimula a expressão de proteínas de troca de íons em brânquias anteriores e posteriores, porém nas anteriores o efeito é menos marcante. Em *N. granulata* durante o estresse hiposmótico (690 mOsm), *in vitro*, houve um aumento na síntese de proteínas no hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias posteriores, contudo, em brânquias anteriores não ocorreram alterações significativas (Bock, 2005).

Nas brânquias anteriores o incremento da via *insulin-like*, no inverno e no verão, é obtido por alterações no receptor, quer seja por aumento de afinidade ou de concentração, sem necessitar de aumento na expressão. Em conjunto esses resultados confirmam um envolvimento diferenciado deste tecido durante o ajuste osmótico. Ao mesmo tempo a elevada afinidade dos sítios de ligação à insulina humana indica a presença de ligandos com homologia a insulina humana, sugerindo que em *N. granulata* haveria diferentes isoformas de proteínas *insulin/ IGF I- like* que se ligariam ao receptor com diferentes afinidades, como verificado no molusco *L. stagnalis* (Smit e cols., 1998).

Quanto ao tecido muscular, no verão o aumento na ligação específica (Tab. 5) ocorreu, possivelmente, em função do aumento da afinidade ao hormônio (Tab. 6). Ao mesmo tempo, houve um aumento significativo da fosforilação do receptor insulínico (Fig. 22). Os valores de IC<sub>50</sub> foram menores no verão (IC<sub>50</sub>= 1,3; 2,5; 2,8 e 6,2 μM, verão, inverno, primavera e outono) e as curvas de competição refletem essa diferença. Já o gráfico de Scatchard mostra reduzidos índices B/F na primavera (Fig. 19B). Nesta estação verificou-se o efeito máximo da sazonalidade sobre o receptor. Na primavera a elevação da concentração de mRNA do CGIRLTK (Fig. 12) foi acompanhada do aumento da concentração de receptores (Tab. 7), da afinidade do

---

receptor ao hormônio (Tab. 6) e da atividade tirosina quinase do receptor (Fig.22). Esses resultados mostram que o tecido muscular apresenta elevada sensibilidade a insulina na primavera.

No músculo mandibular os gráficos de Scatchard apontam a presença de um sítio de ligação com baixa afinidade. Considerando-se as curvas de competição (Fig.16) e os gráficos de Scatchard (Fig. 19) pode-se inferir que os receptores *insulin/IGF I-like* presentes no músculo ligam-se com baixa força de interação molecular a insulina humana. Contudo, a expressão e as características de ligação dos receptores tirosina quinase são alteradas de acordo com a estação do ano.

Em crustáceos o tecido muscular é um tecido de reserva de lipídios, de glicogênio e de proteínas. Kucharski e Da Silva (1991) mostraram que em *N.granulata* coletados diretamente no estuário as reservas de glicogênio muscular são as principais fontes energéticas utilizadas durante a primavera e o verão, quando há um aumento na atividade exploratória dos animais. Ao mesmo tempo, o tecido muscular armazena lipídios na primavera e no verão os quais são utilizados no inverno e no outono como substrato energético. Neste trabalho, as alterações na ligação hormônio receptor verificadas na primavera indicam a necessidade de ativação da via de sinalização à insulina no tecido muscular. Essa ativação deve ter como consequência a ativação de enzimas envolvidas nas vias de síntese de lipídios e de glicogênio neste tecido.

Durante o processo de aclimação ao estresse osmótico, provavelmente, o tecido branquial é o que mais consome energia, uma vez que ele deve assegurar a regulação isosmótica do fluido extracelular, como também a regulação anisosmótica do fluido intracelular (Gilles e Delpire, 1997; Luquet e cols., 2000; Novo e cols., 2005). Luquet e cols. (2005) mostraram que em condições de estresse salino há um aumento na expressão da enzima arginina-kinase nas brânquias anteriores e posteriores de *N.granulata*. Em condições de estresse salino o tecido muscular também participa para o equilíbrio osmótico em *N.granulata* (Schein e cols., 2004; 2005).

## 2 Transporte de Nutrientes Energéticos em *Neohelice granulata*: sazonalidade

Entre os parâmetros físico-químicos analisados, a osmolalidade da água foi o que apresentou a maior variação anual, apesar disso a osmolalidade da hemolinfa alterou-se apenas no verão. Em crustáceos a capacidade osmorreguladora desempenhou um importante papel na evolução e na conquista do habitat estuarino (Bromberg, 1992). Espécies eurialinas, a exemplo do *N.grnulata*, são capazes de tolerar grandes variações de salinidade do meio, com mínimas alterações na concentração osmótica da hemolinfa (Castilho e cols., 2000). Diversos estudos em *N.grnulata* mostraram que esta espécie é capaz de hiper-osmorregular em salinidades reduzidas e hipo-osmorregular em salinidades elevadas (Bianchini e cols., 2008) e seu ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e no verão, respectivamente (Bromberg, 1992; Luquet e cols., 2005; Bianchini e cols., 2008). Em *N.grnulata*, na fase adulta, foi observada uma importante diferença sazonal de tolerância à salinidade e de regulação osmótica e iônica em machos e fêmeas (Novo e cols., 2005). As fêmeas mostram rápidas e acentuadas variações na osmolalidade e na concentração de íons após dois dias de estresse hiposmótico no inverno em relação ao verão. Já nos machos a resposta é oposta e, em condições de estresse hiperosmótico, os caranguejos rapidamente regulam a osmolalidade e a concentração de íons da hemolinfa no inverno em comparação ao verão (Novo e cols., 2005). Os resultados da variação sazonal de salinidade ambiental e sua relação com a osmolalidade da hemolinfa evidenciam que os mecanismos compensatórios de ajuste osmótico do *N.grnulata* são extremamente dinâmicos. Bianchini e cols. (2008) sugerem que as diferenças sazonais de resposta às modificações ambientais de salinidade em *N.grnulata* devam-se as mudanças de permeabilidade iônica e ao

---

transporte ativo associados a alterações sazonais na composição lipídica e na fisiologia das brânquias.

Os dados coletados, *in situ*, mostram que quanto mais alta a temperatura da água, mais baixos os valores de pH da água. No inverno e no outono, quando a temperatura ambiental diminui, ocorre aumento marcante dos valores de pH da água. Contudo, somente no outono ocorreu uma diminuição significativa dos valores de pH da hemolinfa, nas outras estações o pH hemolinfático manteve-se sem alterações significativas. Em outros crustáceos foram encontrados resultados semelhantes de correlação entre o pH ambiental e o hemolinfático e a temperatura da água (Whiteley e cols., 1997).

Em crustáceos, o pH hemolinfático e a temperatura alteram a afinidade e a cooperatividade da hemocianina ao O<sub>2</sub> (efeito Bohr) (Johnson e cols., 1984; 1988; Weber e cols., 2008). Assim, para o *N. granulata* a manutenção do pH em 7,6 – 7,7 a baixa temperatura ambiental, como a constatada no outono, aumentaria a afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub>, diminuindo o aporte de oxigênio aos tecidos, em um período do ano que o animal encontra-se ainda em atividade física em seu habitat. Entretanto, com uma redução do pH hemolinfático para 7,1 a afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub> reduz, minimizando o efeito da baixa temperatura do ambiente sobre a afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub>, mantendo, assim, o aporte adequado de oxigênio aos tecidos. No outono ocorre uma marcante diminuição da osmolalidade do meio ambiente em relação ao verão, aumentando a taxa de consumo de oxigênio em *N. granulata* devido ao esforço de aclimação às variações de salinidades do ambiente (Bianchini e Castilho, 1999). Recentemente, em *Carcinus maenas* foi demonstrado que o pH e a temperatura modificam a curva de saturação da hemocianina (efeito Bohr) (Weber e cols., 2008). Os autores demonstram que a afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub> aumenta em pH 7,8 e que não ocorre uma diferença significativa com a alteração da temperatura de 10°C para 20°C. Entretanto, em pH 7,0 a temperatura de 20°C reduz marcadamente a afinidade em relação aos 10°C (Weber e cols., 2008). Além disso,

alterações de pH no líquido extracelular podem afetar a estrutura terciária das proteínas, reduzindo a afinidade de ligação destes compostos, alterando diversos sistemas celulares, como o transporte de moléculas através da membrana plasmática e a atividade enzimática (Bianchini e cols, 2005).

Em seu habitat, o *N. granulata* é exposto a uma ampla faixa de temperatura ambiente com extremos entre  $18,5 \pm 0,6$  °C a  $32 \pm 2,8$  °C no inverno e no verão, respectivamente. No inverno, apesar da baixa temperatura o pH da hemolinfa encontra-se em 7,6. A estação também influencia o comportamento dos animais e, de modo geral, no inverno os caranguejos são encontrados nas suas tocas e no verão na superfície da lagoa. Essa sazonalidade no comportamento do *N.grnulata* já havia sido relatada (Botto e Irigoyen, 1980; Turcato, 1990) e contribui para a atenuação dos extremos de temperatura e condições inóspitas do meio. Desta forma, como no inverno o animal fica recolhido à toca, a necessidade de aporte de oxigênio aos tecidos reduz e o *N. granulata* mantém o pH 7,6 apesar da reduzida temperatura ambiental.

As brânquias estão envolvidas na hiper- (captação de sal) e hipo-regulação (excreção de sal) em *N. granulata*, geralmente dispostas em fileiras com tecido de fina espessura, e mostram características básicas de um epitélio de transporte de sal (Genovese e cols., 2004; Bianchini e cols., 2008). Durante o processo de aclimação ao estresse osmótico o tecido branquial posterior é o que mais consome energia, uma vez que ele deve assegurar a regulação isosmótica do fluido extracelular, como também a regulação anisosmótica do fluido intracelular (Gilles e Delpire, 1997; Luquet e cols., 2000; Novo e cols., 2005; Bianchini e cols., 2008).

Esses órgãos mostram marcadas alterações estruturais, bioquímicas e fisiológicas de acordo com a salinidade ambiental, resultando em ativa captação de NaCl em caranguejos aclimatados a salinidades baixas. No entanto, os mecanismos envolvidos na aclimação dos caranguejos a salinidades elevadas são menos

compreendidos (Bianchini e cols., 2008). Bianchini e cols. (2008) sugerem que a hiporegulação deve ocorrer por uma ativa secreção de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , o qual deve envolver uma elevada expressão de co-transportadores de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $2\text{Cl}^-$  no epitélio especializado das brânquias posteriores. Além disso, são as brânquias que estão em constante contato direto com o meio externo e são elas que primeiro sofrem as variações sazonais dos parâmetros ambientais.

Em crustáceos a glicose é uma das principais fontes energéticas para os ajustes metabólicos durante o processo de osmorregulação (Nery e Santos, 1993; Oliveira e Da Silva 2000). Assim, nas membranas plasmáticas das brânquias posteriores o transporte de glicose via difusão facilitada pode ser uma estratégia, pois a captação de glicose dependente de sódio interferiria no processo de captação ou secreção deste íon necessário para a aclimação deste caranguejo as variações sazonais e circadianas de salinidade da água ou durante a emersão, quando ocorre a evaporação da água aumentando a concentração de sal na cavidade branquial (Luquet e Ansaldo, 1997; Bianchini e cols., 2008). Evidências bioquímicas e moleculares indicam o envolvimento da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase branquial na captação e secreção ativa de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  durante a hiper e hip- osmorregulação nas brânquias posteriores de *N. granulata* (Castilho e cols., 2001; Luquet e cols., 2005).

Em *N. granulata*, os três pares anteriores de brânquias seriam especializados para a respiração e excreção ativa de amônia. Contudo, a aclimação a extremas salinidades do ambiente aumenta o consumo de oxigênio o que levaria ao aumento da atividade de transporte de gases e da excreção ativa de amônia pelas brânquias anteriores (Bianchini e Castilho, 1999; Bianchini e cols., 2008), aumentando as necessidades energéticas deste órgão.

No presente trabalho a captação de DG foi marcadamente superior que aquela de MG nas brânquias posteriores e anteriores de *N. granulata* em todas as estações. *N. granulata* aclimatados as condições de laboratório a captação de DG em brânquias foi cerca de 50% maior que a captação de MG (Eichler, 2001). A floretina (inibidor do

transporte via GLUT) inibiu marcadamente a captação de DG pelas brânquias posteriores e anteriores, contudo, a incubação em meio assódico não reduziu a captação de DG (Eichler, 2001). Também a captação de MG não foi inibida em meio assódico ou pela presença de florizina (inibidor do transporte de glicose dependente de sódio), sugerindo que o transporte de MG pelas brânquias de *N. granulata* ocorra, provavelmente, via GLUTs. Em vertebrados, Hediger e Rhoads (1997) mostraram que o transporte de MG também pode ocorrer via GLUTs. Wellcomme e Devos (1994) demonstraram, em brânquias de *Carcinus maenas*, a presença de GLUT 4. Proteínas do tipo GLUT têm sido encontradas em outros artrópodes. Pascual e cols. (2006) mostraram que a absorção de galactose no ceco gástrico de *Locusta migratoria* ocorre via proteínas do tipo GLUT. Contrariamente, em brânquias dos moluscos *Mytilus edulis* e *Mytilus californianus*, Pajor e cols. (1992) demonstraram a existência de um sistema de transporte de glicose dependente de sódio.

A maior captação de DG e de MG nas brânquias posteriores e anteriores ocorre na primavera e no verão, quando se tem elevadas temperaturas do ar e da água. Durante a primavera e o verão os animais apresentam intenso deslocamento, sendo encontrados, conforme o horário do dia, nas tocas, na água ou na terra. Desta forma, o aumento da captação de DG e de MG pelas brânquias posteriores e anteriores ocorre nas estações de maior atividade física desse caranguejo e conseqüentemente maior necessidade de substratos energéticos. Também na primavera e no verão, aproveitando a abundância de alimento, o caranguejo *N. granulata* repõe suas reservas energéticas mobilizadas durante os meses de inverno (Kucharski e Da Silva, 1991). Segundo D’Incao e cols. (1988) o *N. granulata* apresenta uma variação sazonal do conteúdo estomacal: no outono e no inverno predominam sedimentos e restos vegetais; na primavera aumenta a freqüência de itens de origem animal; no verão ocorre um equilíbrio entre os três componentes alimentares. É também no verão que ocorre a maior concentração de glicose na hemolinfa deste caranguejo (Kucharski e Da Silva, 1991). Além disso, a menor osmolalidade da água

ocorreu na primavera e a maior no verão, desta forma o *N. granulata* passa pela transição de um meio hiposmótico para outro hiperosmótico. Diversos trabalhos, realizados com este caranguejo, demonstraram a participação do metabolismo de carboidratos no ajuste metabólico necessário à aclimatação tanto ao meio hipo como hiperosmótico e que esta resposta metabólica apresenta uma variação sazonal (Nery e Santos, 1993; Schein e cols., 2005a; 2005b). Nery e Santos demonstraram que no verão o estresse hiperosmótico induz a um aumento dos níveis de carboidratos nas brânquias (Nery e Santos, 1993). Todos esses achados corroboram os resultados de aumento da captação de glicose pelas brânquias nos meses de primavera e de verão, quando ocorrem variações marcantes dos parâmetros ambientais, do comportamento e do metabolismo do *N. granulata*, após um período de reduzida atividade física e metabólica durante os meses de inverno.

Ao contrário das brânquias, o músculo do *N. granulata* sofre menor exposição às variações sazonais dos parâmetros ambientais. Entretanto, o músculo é um tecido de reserva de energia que apresenta variação sazonal de concentração de glicogênio e de lipídios (Kucharski e Da Silva, 1991, Nery e cols., 1993; Luvizoto-Santos e cols., 2003). Além disso, a gliconeogênese muscular participa do ajuste metabólico durante a aclimatação do *N. granulata* ao estresse hipo e hiperosmótico e esta resposta apresenta uma variação sazonal (Schein e cols., 2005a; 2005b).

Em contraste ao observado nas brânquias, não foram verificadas diferenças marcantes entre a captação de DG e de MG no músculo nos meses de inverno, de primavera e de verão. Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, é possível inferir que no tecido muscular existam dois sistemas de transporte de glicose com diferentes propriedades cinéticas e moduladoras: via GLUTs e via co-transporte de sódio. Ahearn e Clay (1988) demonstraram a captação de glicose sódio-dependente em vesículas de membrana da borda em escova das células epiteliais hepatopancreáticas de lagostim. Como o músculo não é um órgão envolvido na ionoregulação em *N. granulata*, a presença do sistema de transporte de glicose Na<sup>+</sup>



---

dependente no músculo, ao contrário das brânquias, não interferiria na captação ou na secreção de sódio necessária à aclimação aos extremos de salinidade ambiente.

No outono a captação de MG pelo músculo foi cerca de 61% menor que aquela da DG. Também no outono ocorre aumento significativo do pH da água e uma redução marcante no pH da hemolinfa (pH 7,1). Em hemáceas de *Rana balcanica* foi demonstrado que a permeabilidade celular aos íons sódio e potássio é dependente do pH extracelular; em pH ácido há um aumento na entrada de sódio e perda de potássio pelas células. Assim uma alteração no potencial eletrogênico celular pode comprometer a atividade da bomba  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase (Kaloyianni e Doukakis, 2003; Wehner e cols., 2004). Dessa maneira, a redução do pH da hemolinfa, pode interferir sobre o sistema de transporte de glicose sódio dependente no músculo nos meses de outono, preponderam, assim, a captação de glicose via difusão facilitada. Em vesículas de membrana da borda em escova do epitélio hepatopancreático de lagostim o baixo pH luminal estimula o transporte de glicose por aumentar a afinidade do sistema de transporte dessa hexose (Ahearn e Clay, 1988). Em *L. migratoria* o transporte de galactose via proteínas tipo GLUT não é afetado por diferenças no pH (de 4,2 a 8,2) no ceco gástrico (Pascoal e cols., 2006).

No presente trabalho constata-se marcante redução da captação de DG e de MG pelo tecido muscular nos meses de verão. Esta redução da captação de glicose pode ser explicada, em parte, pelo reduzido nível de glicogênio verificado neste tecido nos meses de verão (Kucharski e Da Silva, 1991). No verão houve um aumento significativo da concentração de glicose na hemolinfa. A maior concentração de glicose hemolinfática no verão pode ser uma conseqüência do maior ingestão de alimentos ou menor utilização periférica desta hexose. Também Schein e cols. (2005a) verificaram que no verão a capacidade muscular de síntese de  $^{14}\text{C}$  glicose a partir de  $^{14}\text{C}$  alanina, a atividade e a expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK 4.1.1.32) estão aumentadas em comparação ao inverno. Assim, no verão o aumento da glicemia também pode ser uma conseqüência do incremento na produção

---

tecidual de glicose com uma possível redução na captação de glicose pelos dois sistemas de transporte.

A exemplo de outros invertebrados, em *N.granulata*, mantidos em salinidade de 20 ‰, a determinação dos aminoácidos livres presentes na hemolinfa mostrou a presença de aminoácidos essenciais e não essenciais, sendo que os aminoácidos livres glicina, serina, arginina, alanina e prolina encontram-se em maior concentração (Schein, 1999). Durante o estresse hiperosmótico a concentração de glicina na hemolinfa diminui 60% em *N.granulata*. Já em condições de estresse hiposmótico esse aminoácido sofre grande alteração em seus níveis circulantes com incremento de 200 vezes (Schein, 1999).

No presente trabalho foi utilizado o análogo não metabolizável MeAIB que é captado pelas células via sistema A sódio dependente (Guidotti e Gazzola, 1992; Schein, e cols., 2005, Jahn e cols., 2006).

Em crustáceos foi demonstrado que o tecido branquial é o tecido que possui maior capacidade de síntese de proteínas, seguido pelo hepatopâncreas, músculo e coração (Lyndon e Houlihan, 1998). No presente trabalho a maior captação de MeAIB pelas brânquias (no outono) foi cerca de 1,8 vezes maior que aquela verificada no músculo (primavera). Em *Mytilus edulis*, as brânquias são responsáveis por 70% a 80% da captação de aminoácidos da água do mar para os tecidos (Rice e Stephens, 1988).

A avaliação sazonal da captação do análogo MeAIB mostrou que somente no outono houve um aumento de transporte via sistema A nas brânquias posteriores e anteriores de *N. granulata*. Uma importante característica do sistema A é ser o principal sistema de transporte de aminoácidos sujeito a regulação por condições ambientais e osmolalidade extracelular (Schein e cols, 2005b).

Assim, o aumento da captação de MeAIB pelas brânquias anteriores e posteriores no outono seria influenciado por fatores ambientais e pelas condições do líquido extracelular. No outono ocorre uma queda significativa da temperatura

ambiente e da osmolalidade da água do habitat. Em espécies hiper-reguladoras como o *N. granulata*, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase e a anidrase carbônica são as principais enzimas envolvidas no transporte ativo de íons do ambiente hiposmótico através das brânquias (Péqueux, 1995; Viatale e cols., 1999; Castilho e cols., 2001). Estudos mostram que a curto-prazo os aumentos na atividade enzimática são relacionados a um estímulo nas moléculas de enzimas pré-existentes, já à longo prazo estão associados com a síntese de novas unidades de enzimas (Luquet e cols., 1990). O aumento da captação de aminoácidos pelas brânquias no outono levaria a um aumento da síntese de enzimas que permitiriam a aclimação do *N. granulata* ao meio hiposmótico do outono, inverno e primavera. Trabalho realizado com machos e fêmeas de *N. granulata* sugere que a aclimação ao estresse hiposmótico depende da capacidade do caranguejo em ativar a síntese protéica (Novo e cols., 2005). Também os autores sugerem que 15 dias de aclimação as condições de laboratório não permitem eliminar os efeitos sazonais de aclimatização dos processos de regulação osmótica e iônica ocorridos em *N. granulata in situ* (Novo e cols., 2005). Em brânquias de *N. granulata* as diferenças sazonais na resposta às variações de salinidade ambiental estão associadas com mudanças sazonais na composição lipídica e na utilização de estratégias fisiológicas diversas (Bianchini e cols., 2008).

No tecido muscular a maior captação de MeAIB ocorre na primavera, diminuindo gradualmente no verão e no outono. É na primavera que ocorre um aumento marcante da temperatura do ar e da água, após as baixas temperaturas do período de inverno. Também na primavera temos os menores valores de osmolalidade da água da lagoa Tramandaí. Schein e cols. (2005) demonstraram em músculo mandibular de *N. granulata* aumento da síntese de glicose a partir de <sup>14</sup>C-alanina e da atividade da enzima PEPCCK durante a aclimação ao estresse hiposmótico no verão. No músculo, os aminoácidos devem ser desaminados e suas cadeias carbônicas utilizadas como substratos na via gliconeogênica. Schein e cols. (2005) mostraram que a gliconeogênese é uma das vias envolvidas no ajuste osmótico durante o choque

---

hiposmótico em *N. granulata*. Na primavera os animais aumentam sua atividade locomotora, pois começa o início do período reprodutivo, contudo, os valores de glicose na hemolinfa ainda estão reduzidos em comparação ao verão. O aumento da produção de glicose via gliconeogênese seria favorável aos processos osmorregulatório, reprodutivo e exploratório que ocorrem nesta estação.

Já o tecido muscular apresenta um padrão diferencial de transporte de aminoácidos neutros em comparação as brânquias. Neste tecido a hipo-osmolalidade verificada nas estações do outono e inverno não alteraram o índice de captação de aminoácidos neutros, entretanto, na primavera houve um aumento significativo nos índices de captação via sistema A. Estudos anteriores mostram que nas diversas condições experimentais estudadas (hipóxia, anoxia, estresse hipo-hiper-osmótico) o tecido muscular mostra um padrão de resposta metabólica distinto ao observado para brânquias e hepatopâncreas (Schein e cols., 2005b; Pelegrino, 2006; Maciel e cols., 2008). Nos dois anos investigados neste trabalho verificou-se nos meses de inverno e de primavera as menores salinidades da água do estuário, entretanto, a maior alteração intra-estação ocorreu no inverno. Schein e cols. (2005b) mostraram que a capacidade gliconeogênica, a expressão e a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK 4.1.1.32) muscular estão, marcadamente, diminuídas no inverno quando comparadas ao verão. Já na primavera o aumento na captação de aminoácidos neutros pode ocorrer em resposta à ativação da capacidade gliconeogênica nos meses de temperaturas mais elevadas, a exemplo do mostrado por Schein e cols. (2005b). Essas evidências sugerem o papel do músculo na manutenção dos níveis circulantes de substratos energéticos e em condições de regulação osmótica, como verificado em outros trabalhos (Schein e cols., 2005b; Pelegrino, 2006; Maciel e cols., 2008).

**CONCLUSÃO**

## CONCLUSÃO

Nas brânquias posteriores há no inverno e no verão o aumento da expressão gênica do CGIRLTK, da interação hormônio-receptor (afinidade no inverno e concentração de receptores no verão) e da atividade tirosina quinase do receptor *insulin-like* sugerem o envolvimento da via de sinalização *insulin-like* nos processos de aclimatação aos estresses de salinidade e de temperatura em *N.granulata*. Em brânquias posteriores o transporte de glicose via transporte facilitado (GLUT) eleva-se no verão, já o transporte via sódio- dependente (SGLT) está diminuído em brânquias posteriores no verão. Essas alterações na capacidade de captação e no tipo de transportador de glicose minimizariam os efeitos das oscilações sazonais dos parâmetros ambientais do meio estuarino.

Nas brânquias anteriores o padrão sazonal de interação hormônio-receptor, a atividade tirosina quinase e a captação de glicose e aminoácidos são similares aquelas verificadas nas brânquias posteriores. No entanto, as brânquias anteriores são mais responsivas a insulina e mostram acentuada porcentagem de ligação específica e de afinidade a insulina humana ao receptor *insulin-like*. Embora esses órgãos não sejam, prioritariamente, envolvidos com a regulação osmótica as variações extremas de fatores ambientais como a salinidade e a temperatura implicam em maior atividade desses órgãos para a manutenção da homeostase em *N.granulata*.

No músculo mandibular o aumento da expressão do gene do CGIRLTK, da captação de glicose via GLUT e SGLT e da captação de aminoácidos verificados na primavera, sugerem estratégias fisiológicas para a execução de funções como a locomoção e a reprodução própria desta estação do ano.

A sazonalidade dos fatores ambientais afeta a expressão do gene GCIRLTK, as características de ligação e de transdução do sinal insulínico, o transporte de nutrientes e de osmólitos em brânquias anteriores e posteriores e em músculo de *N. granulata*.

**PERSPECTIVAS**

Esta Tese abre novas perspectivas na investigação do sistema de sinalização *insulin-like* em *N.granulata*. Além disso, a padronização da técnica de expressão do CGIRLTK permitirá a ampliação dos conhecimentos sobre o envolvimento do receptor tirosina quinase em diversas condições experimentais, a exemplo dos estresses iônico (pH), salino (hipo ou hipersalinidade) e de teor O<sub>2</sub> dissolvido (hipóxia, anóxia).

A aquisição do programa Kell 6.0 permitirá avaliar as características de ligação a outros tipos de hormônios a exemplo do IGF-1, das bombixinas, das insulinas de peixes ou até mesmo da *insulin-like* a ser isolada do próprio *N. granulata*. Essa possibilidade permitirá a compreensão das diferenças teciduais nas respostas dos receptores tirosina quinase. Também o conhecimento da afinidade e da concentração de receptores pode direcionar a investigação dos efeitos bioquímicos e fisiológicos do hormônio teste.

Outro aspecto interessante de ser investigado diz respeito as proteínas citoplasmáticas envolvidas em fases posteriores da transdução do sinal da insulina, como as proteínas da família do PI3K, Akt/PKB, seus efeitos biológicos e perfil sazonal.



## REFERÊNCIAS

Ahearn, G.A., Maginniss, L.A. (1977) Kinetics of glucose transport by the perfused mid-gut of the freshwater prawn *acrobrachium rosenbergii*. **J.Physiol.** 271, 319–336.

Alessandra Augusto, Lewis Joel Greene, Helen Julie Laure, and John Campbell McNamara. (2007). The Ontogeny Of Isosmotic Intracellular Regulation in The Diadromous, Freshwater Palaemonid Shrimps, *Macrobrachium Amazonicum* and *M. Olfersi* (Decapoda). **Journal of Crustacean Biology**, 27(4): 626–634.

Baker, P.F. e Carruthers, A. (1980) Insulin stimulates sugar transport in giant muscle fibers of barnacle. **Nature.** 286, 276-279.

Barber, A., Jordana, R., Ponz, F. (1979) Competitive kinetics of sugar active transport in snail intestine. **Rev. Esp. Fisiol.** 35, 243– 248.

Bianchini, A.; Lauer, M.M; Nery, L.E.M.; Colares, E.P.; Monserrat, J.M.; Santos Filho, E. A. (2008) Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.** Article in press.

Bishop, S.H.; Burton, R.S. (1993) Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. **Comp. Biochem. Physiol.**, 106 A (1): 49-56.

Bishop, S.H.; Greenwalt, D. E.; Martin, A.K., Paynter, K.T. Ellis, L.L. (1994) Metabolic regulation of proline, glycine and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. **J. Exp. Zool.**, 268, 151-161.

Bock, C. (2005) Efeitos do estresse hiposmótico ou hiperosmótico, in vitro, sobre a síntese de proteínas, mobilização de proteínas, captação e oxidação de aminoácidos, em tecidos do caranguejo *Chasmagnathus granulata*. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Departamento de Fisiologia. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bond-Buckup, G.; Fontoura, N.F.; Marroni, N.P.; Kucharski, L.C. (1991) O caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia. **Editores da Universidade** - UFRGS, Porto Alegre, 71 p.

Botto, J.L. e Irigoyen, H.P. (1980) Bioecologia 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. Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimento Plataf. Cont. Atlant Sur, **UNESCO**-Montevideo, p.161-169.

Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal Biochem.** v.72, p.248-254.

Bradshaw, W e Holzapfel, C. (2007a). Tantalizing *timeless*. **Science**. Vol. 316. p 1851-1852.

Bradshaw, W e Holzapfel, C. (2007b). Evolution of Animal Photoperiodism. **Annual. Rev. Evol. Syst.** 38: 1-25.

Bromberg, E. (1992). Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão. **Tese de Mestrado**. Universidade de São Paulo. São Paulo. Brazil.

Castiglioni, D.; Oliveira, G.T.; Bond-Buckup, G. (2006). Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* (Crustácea, Decapoda, Parastacidae). **Iheringia, Ser. Zool.** 96 (4), 413-417.

Castilho, P.C.; Martins, I.A. Bianchini, A. (2001). Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). **Journal of experimental Marine Biology and Ecology.** 256, 215-227.

Cervino, C.O.; Luquet, C.M.; Haut, G.E.; Rodriguez, E.M. (1996) Preferências de salinidade do caranguejo estuarino *Chasmagnathus granulata* (Dana 1851) após longo período de aclimação. **Atlântica**, 18:69-75.

Chan, S.J.; E Steiner, D. F. (2000) Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. **Amer. Zool.** V.40, p.213-222.

Charmantier – Dauers M., Charmantier G., Janssen K.P.C., Aiken D.E., Van Herp F. (1994). Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. **Gen Comp Endocr.** 94: 281-293.

Chittó, A.(2006) Estudo do Metabolismo de carboidratos e lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão. **Tese de Doutorado.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. POA-RS-Brasil.

Chuang, N. N. e Wang, P.C. (1993) Characterization of phosphotyrosyl protein phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). **J. Exp. Zool.** v.266, p.181-187.

Claeys, I; Simonet, G; Poels, J.; Van Loy,T. (2002) Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. **Peptides.** 23: 807–816.

D’Incao, F. Ruffino, M.L.; Silva, K.G.; Braga, A. C. (1990) Habito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (decapoda grapsidae) na barra de Rio Grande, RS. **Atlântida.** 12 (2), 85-93.

Donahoo, W.; Jensen, D.; Shepard, T. e Eckel, R. (2000). Seasonal Variation in Lipoprotein Lipase and Plasma Lipids in Physically active, Normal Weight Humans. **JCE & M.** Vol.85, n 9. p. 3065-3068.

Drach, F. e Tchernigovtzeff, C. (1967) Sur la method de determination dès stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu,** 161: 595-607.

Dragolovich, J, Pierce, SK, (1992). Comparative time courses of inorganic and organic osmolyte accumulation as horseshoe crabs (*Limulus-polyphemus*) adapt to high salinity. **Comp.Bioch. and Physiol. A-Physiology** 102 (1), 79-8.

Dutra, B.K.; Castiglioni, D.S.; Santos, R.B.; Bond-Buckup, G.; Oliveira, G.T. (2007). Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of Hyalella (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian high lands. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. 148: 239-247.

Eckhardt, E.; Pierrot, C.; Thuet, P.; Van Herp, F.; Daures, C.M.; Trilles, J.P; Charmantier, G. (1995) Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Poligrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide. **Gen. Comp. Endocrinol.** 99:169-177.

Eichler, P. (2001) Transporte de glicose e aminoácidos nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. POA-RS-Brasil.

Freire, C.A., Mcnamara, J.C. e Rosa, J.C., Greene L.J. (1995). Neuroendocrine control of osmotic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). Free amino-acid concentrations in the hemolymph. **Gen. Comp. Endocr.** 100(1), 83-91.

Gallardo, M.A.; Cannals, P.; Albi, J.L.; Pesquero, J.; Sanchez, J. (1997). Seasonal variation in uptake of short-chain neutral amino acid by red blood cells and hepatocytes in trout (*Salmo trutta*). **J. Exp. Biol.** 200, 2781-2787.

Gallardo, N., Carrillo, O., Moltó, E., Deás, M., González-Suárez, R., Carrascosa, J.M., Ros, M., Andrés, A (2003) Isolation and biological characterization of a 6-kDa protein from hepatopâncreas of lobster *Panulirus argus* with insulin-like effects. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.131, p.284-290.

Garriga, C., Moreto, M., Planas, J.M. (1999). Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes. **J. Physiol.** 514, 189–199.

Gebauer, P.; Paschke, K; Anger, K. (2004). Stimulation of metamorphosis in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851): temporal window of cue receptivity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** 311, 25-36.

Genovese, G; Luchetti, C G; Luquet, C M. (2004) Na/K ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. **Marine Biology** 144: 111-118.

Gerencser, G.A., White, J.F., (1980). Membrane potentials and chloride activities in epithelial cells of *Aplysia* intestine. **Am. J. Physiol.** 239, 445– 449.

Gilles R. (1977). Effects of osmotic stress on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. **Comp Bioch Physiol.** 56 A, 109

Gilles, R. (1982) Osmoregulatory process in molluscs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, 6:1-36.

Gilles, R. (1987) Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. **Curr. Topics Membrane Transp.**, 30: 205-247.

Gilles, R. (1997) “Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.** 117A: 279-290.

Gilles, R., e Delpire, E., (1997). Variations in salinity, osmolarity and water availability: Vertebrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed.). **Handbook of Comparative Physiology.** Oxford University Press, New York,. p. 1523-1586.

Gimenez, F.; Goldemberg, A.L.; Díaz, A.O. (2007). Studies Of The Claws Of The Crab *Cyrtograpsus angulatus* Dana (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). **Biociências**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 29-39.

Gricourt, L.; Bonnac, G.; Boujard, M.; Kellner, K. (2003) Insulin-like system and growth regulation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: hIGF-I effect on protein synthesis of mantle edge cells and expression of an homologous insulin receptor-related receptor. **Gen. Comp. Endocrinol.** v.134, p.44-56.

Gual, p.; Gonzalez, t.; Grémeaux, t.; Barrés, r.; Marchand-brustel, y.; Tanti, j.f. (2003a) Hyperosmotic stress inhibits insulin receptor substrate-1 function by distinct mechanisms in 3t3-l1 adipocytes. **J.Biol. Chem.** v.278, n.29, p.26550-26557.

Gual, P.; Le. Marchand-Brustel, Y.; Tanti, JF. (2003b). Positive and negative regulation of glucose uptake by hyperosmotic stress. **Diabetes Metab.** 29, 566-575.

Guidotti, G.G. and Gazzola, G. In: Kilberg, M.S. and Häussinger, D. (1992) Mammalian Amino Acid Transport. Mechanisms and Control. Plenum Press. **New York, New York.**

Gutierrez, A.; Nieto, J.; Pozo, F.; Stern, L.; Schoofs., L. (2007) Effect of insulin/IGF-IIlike peptides on glucose metabolism in the white shrimp *Penaeus vannamei*. **General and Comparative Endocrinology.** 153:170-175.

Gwinner e Dittami, (1990). In: Dantzeler, W.H. (ed.). (1997). Handbook of Comparative Physiology. **Oxford University Press**, New York. p.1654-1763.

Gwinner, (1981). In: Dantzeler, W.H. (ed.). (1997). **Handbook of Comparative Physiology.** Oxford University Press, New York. p.1654-1763.

Gwinner, (1986). In: Dantzeler, W.H. (ed.). (1997) **Handbook of Comparative Physiology.** Oxford University Press, New York. p.1654-1763.

Gwinner, (1988). In: Dantzeler, W.H. (ed.). (1997). **Handbook of Comparative Physiology**. Oxford University Press, New York. p.1654-1763.

Hager, S.R. e Bittar, E.E. (1985). Hormones and barnacle muscle fiber as a preparation. **Comp. Biochem. Physiol.** 99, 215-218.

Hediger, M.A. e Rhoads, D.B. (1997). Molecular Physiology of sodium-glucose co-transporters. **Physiological Reviews**. 74, 993-1026.

Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., Wright, E.M. (1987). Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. **Nature**. 330, 379– 381.

Huong, D.T.T., Yang, W., Okuno, A., Wilder, M.N. (2001). Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability. **Comp. Biochem. Physiol. A** 128, 317–326.

Jahn, M.P.; Cavagni, G.M.; Kaiser, D.; Kucharski, L.C. (2006). Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 334, 1-9.

Jeckel, W. H.; Demoreno, J. E. A.; Moreno, V. J. (1991). Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. **Comp. Biochem. Physiol.**, B 98: 253-260.

Johnson, B. A.; Bonaventura, C. and Bonaventura, J. (1984). Allostery in *Callinectes sapidus* Hemocyanin: Cooperative Oxygen Binding and Interactions with L-Lactate, Calcium, and Protonst. **American Chemical Society**. 23, 872-878.

Johnson, B. A.; Bonaventura, C. and Bonaventura, J. (1988). Allostery in *Callinectes sapidus* Hemocyanin: Cooperative Oxygen Binding and Interactions with L-Lactate, Calcium, and Protonst. **Biochemistry** 27, 1995-2001.



Jonas, E.A.; Knox, R.J.; Kaczmarek, L.K.; Schwartz, J.H.; Solomon, D.H. Insulin receptor in *Aplysia* neurons: characterization, molecular cloning, and modulation of ions currents. **J. Neurosci.** v.16, p.1645

Joost, H.G. e Thorens, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. **Mol. Membr. Biol.** 18 (4), 247-56.

Jun Xu, Y. e Wu, K. (2006). Seasonality and interannual variability of freshwater inflow to a large oligohaline estuary in the Northern Gulf of Mexico. **Estuarine, Coastal and Shelf Science.** 68, 619-626.

Kaloyianni, M. e Doukakis, I. (2003). Effect of Adrenaline on Glucose Transport in Red Cells of *Rana balcanica*. **Gen. Physiol. Biophys.** 22, 69-80.

Kinne, R.K.H. (1993) The role of organic osmolytes in osmoregulation - from bacteria to mammals. **J. Exp. Zool.** 265 (4): 346-355.

Kipp, H., Kinne-Saffran, E., Bevan, C., Kinne, R.K., (1997). Characteristics of renal Na<sup>(+)</sup>-D-glucose cotransport in the skate (*Raja erinacea*) and shark (*Squalus acanthias*). **Am. J. Physiol.** 273, 134–142.

Kube, S.; Sokolowski, A.; Jansen, J.M.; Schiedek, D. (2007). Seasonal variability of free amino acids in two marine bivalves, *Macoma balthica* and *Mytilus spp.*, in relation to environmental and physiological factors. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.** 147, 1015-1027.

Kucharski, L.C., Schein, V., Capp, E., (2002). In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. **Gen Comp Endocr** 125 (2): 256-263.

Kucharski, LC; Da Silva, RSM. (1991 a). Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *C granulata* (Dana 1851). **Comp. Biochem. Physiol.** 99A, 215-218.

Kucharski, LC; Da Silva, RSM. (1991b). Seasonal Variations in the energy Metabolism in estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Com. Biochem. Physiol.** A. 100 (3), 599-602.

Lamitina, T.S. e Strange, K. (2005) Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. **Am J Physiol Cell Physiol** 288:467-474.

Lawrence, A.L., Lawrence, D.C., Greer, M.L., Mailman, D. (1967). Intestinal absorption in the sea cucumber, *Stichopus parvimensis*. **Comp. Biochem. Physiol.** 20, 619–627.

Lorenzon, S.; Giulianini, P.G.; Martinis, M.; Ferrero, E.A. (2007). Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in American lobster *Homarus americanus*. **Biochemistry and Physiology, Part A.** 147, 94-102.

Lucu, C., Towle, D.W. (2003). Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in gills of aquatic crustacea. **Comp. Biochem. Physiol.** A 135, 195–214.

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** 73: 53-67.

Luquet, C.M., Ansaldo, M. (1997). Acid-base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol. A** 117, 407–410.

Luquet, C.M., Postel, U., Halperin, J., Urcola, M.R., Marques, R. and Siebers, D. (2002). Transepithelial potential differences and Na<sup>+</sup> flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. **J. Exp.Biol.** 205, 71-77.

Luquet, C.M., Weihrauch, D., Senek, M., Towle, D.W. (2005). Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. **J. Exp. Biol.** 208, 3627–3636.

Luvizzotto-Santos R.; Lee, J. T.; Branco, Z. P. Bianchini, A. e Nery, L. E. M. (2003) Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea – Grapsidae). **J. Exp. Zool.** 295A: 200-205.

Maciel, J.E; Valle, S.C.; Kucharski, L. C.; Da Silva, R. S. M. (2008). Lactate Metabolism in the Muscle of the Crab *Chasmagnathus granulatus*. **Comp. Bioch. And Physiology A. Molecular and Integrative Physiology**. 2008. Article in Press.

Mane-Garzon, F.; Dei-Cas, E.; Spector, B.H. Leymonte, J. (1974) Estudios sobre la biologia del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. In: Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. **Physis, Seccion A.** 33 (86):163-171.

Manor R, Weil S, Oren S, Glazer L, Aflalo ED, Ventura T, Chalifa-Caspi V, Lapidot M, Sagi A. (2007) Insulin and gender: an insulin-like gene expressed exclusively in the androgenic gland of the male crayfish. **Gen Comp Endocrinol.** Jan 15;150 (2):326-36.

Mantel, L.H.; Farmer, L.L. (1983). Osmotic and ionic regulation. In : Bliss, E.; Mantel, L.H. (ed), **The Biology of Crustacea.** v. 5, Academic Press, London. pp. 53-161.

Marquese, A., Kucharski, L.C.; Da Silva. (2006). Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 332, 198-205.

Marqueze, A., (2004). Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulata* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Martins, H. (2002). Efeito da insulina sobre a atividade da enzima Na<sup>+</sup>-k<sup>+</sup> ATPase branquial, a síntese de proteínas e captação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Chasmagnathus granulata* (DANA, 1851). **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

McNamara, J.C., Rosa, J.C., Greene, L.J., Augusto, A. (2004). Free amino acids pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. **Mar. Freshw. Behav. Physiol.** 37, 193–208.

Medler, S; Brown, K.J.; Chang, E Mykles, A. (2005). Eyestalk Ablation Has Little Effect on Actin and Myosin Heavy Chain Gene Expression in Adult Lobster Skeletal Muscles. **Biol.Bull.** 208: 127–137.

Menone, M. Miglioranza, K., Iribarne, O., Aizpún de Moreno, J., Moreno, V. (2004). The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulata* in trapping organochlorine pesticides. **Marine Pollution Bulletin** 48, 240–247.

Moles, M. (2006) Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology.** 142 (3) 390-400

Nagata, K., Hori, N., Sato, K., Ohta, K., Tanaka, H., Hiji, Y. (1999). Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine. **Am. J. Physiol.** 276, 1251– 1259.

Navarro, I.; Leibush, B.; Moon, T.W.; Plisetskaya, E.M; Banos, N.; Mendez, E.; Planas, J.V.; Gutierrez, J (1999) Review. Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I) and glucagon: the evolution of their receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B.**122:137-153

Nery, L.E.M; Santos, E.A.; Bianchini, A.; Gonçalves, A.A. (1993). Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** 26:1291-1296.

Novo, S.; Miranda, R.B.; Bianchini, A. (2005). Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda). 2005. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 323, 118-137.

Okuma, E. e Abe, H. (1994). Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. **Comp. Biochem. Physiol.** 109A(1), 191-197.

Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C., Da Silva, R. S. M. (2004a). Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **J. Exp. Zool.** 301A, 240-248.

Oliveira, G. T.; Rossi, I. C.; Kucharski, L. C. e Da Silva, R. S. M. (2004b). Hepatopancreas gluconeogenesis during fasting in crabs previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.** A 137: 383-390.

Oliveira, G.T. e Da Silva, R.S.M. (1997). Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, 118 A (4): 1429-1435.

Oliveira, G.T. e 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.** 127 B, 375-381.

Oliveira, G.T.; Fernandes, F.A.; Bueno, A.A.P.; Bond-Buckup, G. (2007). Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, aeglidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. 147, 600-606.

Ouwens, D.M.; Mesquita, D.S.G.; Dekker, J.; Maassen, J.A. (2001). Hyperosmotic stress activates the insulin receptor in CHO cells. **Bioch. Bioph. Acta.** v.1540, p97-106.

Pajor, A.M., Hirayama, B.A., Wright, E.M. (1992). Molecular biology approaches to comparative study of Na<sup>(+)</sup>-D-glucose co-transport. **Am. J. Physiol.** 263, R489– R495.

Pascual, I.; Berjón, A.; Lostao, M.P.; Barber, A. (2006). Transport of D-galactose by the gastrointestinal tract of the locust, *Locusta migratoria*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B. 143, 20 – 26.

Pelegriño, R. (2006). Efeito do Jejum e da realimentação sobre a gliconeogênese e a neoglicogenogênese no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido previamente à dieta rica em proteínas ou carboidratos. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. POA-RS-Brasil.

Pellegrino, R., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M. (2008). Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 358, 144–150.

Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. **J. Crust. Biol.** 15, 1–60.

Piggins, H e Meijer, J. (2007). Biological clocks and endocrine function in vertebrates and invertebrates. **General and Comparative Endocrinology** 152.142-143

Plisetskaya, e M.E Duan, C.M. Insulin and insulin-like growth-factor-I in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* injected with streptozotocin. (1994) **Am. J. Physiol. Regulat. Integrat. Comp. Physiol.** v.257,n.5, p.R1408-R1412.

Porte, Jr., D.; Baskin, D.G. and Schwartz, M.W. (2005) Insulin Signaling in the Central Nervous System A Critical Role in Metabolic Homeostasis and Disease From *C. elegans* to Humans. **Diabetes.** Vol.54. 1264-1276.

Radford, C.A.; Marsden, I.D.; Davison, W.; Taylor, H.H. (2005). Haemolymph glucose concentrations of juvenile rock lobsters, *Jasus edwardsii*, feeding on different

carbohydrate diets. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A 140, 241-249.

Roy, S.; Hansen, I.A.; Raikhel, A.S. (2007) Effect of insulin and 20-hydroxyecdysone in the fat body of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. 37:1317- 1326.

Rulifson, E.J.; Kim, S.K.; Nusse, R. (2002) Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. **Science**. v.296, p.1118-1120,

Rusakov, I.; Kolychev, A. P.; Shipilov, V. N. and Bondareva, V. M. (2003) Insulin-Like Peptides of the Cerebropleural Ganglion of the Mollusc *Anodonta cygnea*: Isolation, Purification, and Radioligand Analysis. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**. Vol. 39, No. 4, 2003, pp. 425

Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**. v.413, p.799-806.

Sanders, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. I. Insulin immunoreactivity. (1983a). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.50, p.366-373.

Sanders, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus*. II. Insulin-like biological activity. (1983b). **Gen. Comp. Endocrinol.** v.50, p.374-377.

Sanders, B. (1983c) Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . III. No glucostatic role. **Gen. Comp. Endocrinol.** V.50, p.378-382.

Santos, E.A e Nery, L.E.M. (1987). Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.A.** 87 (4):1033-1035.

Sanvitto, G.L. (1992) Estudo Filogenético dos receptores cerebrais para insulina. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Scapin, S e Incerpi, S. (1992) Annual variations in the binding of insulin to hepatic membranes of the frog *Rana esculenta*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 86, 128-137.

Scatchard, G. (1949) The attraction of protein for small molecules and ions. **Ann N Y Acad Sc.** v.51, p.660-667.

Schein V, Chitto ALF, Etges R, Kucharski, L. C., Wormhoudt, Da Silva R.S.M. (2005a). Effects of Hypo- or Hyperosmotic Stress On Gluconeogenesis, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity, and Gene Expression in Jaw Muscle of The Crab *Chasmagnathus granulata*: Seasonal Differences **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology** 316 (2), 202-206.

Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. (2005b). Effects of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Bioch. Physiol.B.** v.140, p.561-567.

Schleich, C.E., Goldemberg, L.A., Mananes, A.A.L. (2001). Salinity dependent Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase activity in gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. **Gen. Physiol. Biophys.** 20, 255–266.

Seki, Y.; Sato, K.; Kono, T.; Akiba, Y. (2003). Broiler chickens (*Ross strain*) lack insulin responsive glucose transporter GLUT 4 and have GLUT 8 cDNA. **General and Comparative Endocrinology.** 133, 80-87.

Serrano L, Blanvillain G, Soyez, D. (2003). Putative Involvement Of Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms In The Neuroendocrine Mediation Of Osmoregulation In The Crayfish *Astacus leptodactylus*. **Journal of Experimental Biology.** 206 (6), 979-988.



Shinagawa, A., Suzuki, T., Konosu, S. (1995). Preliminary studies on the effects of salinity on intracellular nitrogenous osmolytes in various tissues and hemolymph of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). **Crustaceana**. 68, 129–137.

Silva-Castiglioni, D. Dutra, B. K.; Oliveira, G.T.; Bond Buckup, G. (2007). Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, PartA**. 148. 204213.

Smit, A.B.; Vankesteren, R.E.; Li, K.W.; Vanminnen, J.; Spijker, S.; Vanheerikhuizen, H.; Geraerts, W.P.M. (1998) Towards understanding the role of insulin in the brain: Lessons from insulin. **Progress in Neurobiology**. v.54, n.1, p.35-54.

Skorokhod A, Gamulin V, Gundacker D, Kavsan V, Muller IM, Muller WEG.(1999). Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. **Biological Bulletin**. v.197, n.2, p.198-206.

Stewart, M.G., Bamford, D.R. (1976). Absorption of soluble nutrients by the mid-gut of the bivalve *Mya arenaria*. **J. Molluscan Stud.** 42, 63– 73.

Tan, C.H. and Choong K.Y. (1981). Effect of hyperosmotic stress on haemolymph protein, muscle ninhydrin-positive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Comp Biochem Physiol A**. 70, 485-489.

Towle, D. e Weihrauch, D. (2001). Osmoregulation by Gills of Euryhaline Crabs: Molecular Analysis of Transporters. **American Zoologist**. 770-780.

Trapp, M. (2005). Efeitos do Estresse Hipo e Hiperosmótico Sobre às Características do Receptor à Insulina e Sobre a Captação de Glicose em Brânquias do Caranguejo *Chasmagnathus Granulata*. **Tese de Doutorado**. CB- Fisiologia. ICBS- UFRGS. POA-RS

Trapp, M. (2002) Autofosforilação do receptor e transdução do sinal da insulina em brânquias de caranguejos *Chasmagnathus granulata* adaptados a diferentes dietas e ao jejum. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia)

Trapp, M; Schein, V; Wache, Y; Favrel, P; E.Capp; Kucharski, L.C.; Wormhoudt, A e Da Silva, R.S.M. (2002) Tyrosine Kinase Activity of the insulin receptor from *Chasmagnathus granulata* gills and partial cloning of insulin receptor gene. **International Proceedings Division**. Bonn:Monduzzi.p 375-379.

Turcato, G.S. (1990) Estudo bioecológica do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. **Dissertação** (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

Underwood, H.A.; Wassmer, G.T.; Page, T.L. (1997). In: Dantzeler, W.H. (ed.). **Handbook of Comparative Physiology**. Oxford University Press, New York. P.1654-1763.

Van de Velde, S.; Badisco, B.; Guy Smaghe. (2007) Insulin-like peptides in *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera): Detection, localization and identification. **General and Comparative Endocrinology** 153: 72-79.

Verri, T.; Mandal, A.; Zilli L.; Bossa, D.; Mandal, P.K.; Ingrosso, L.; Zonno, V.; Vilella, S.; Ahearn, G.A.; Storelli, C. (2001). D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. **Comp Biochem Physiol A** 130, 585–606.

Vilella, S.; Zilli, L.; Ingrosso, L.; Schiavone, R.; Zonno, V.; Verri, T.; Storelli, C. (2003). Differential expression of Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransport in isolated cells of *Marsupenaeus Japonicus* hepatopancreas. **J Comp Physiol B** . 173: 679–686

Vinagre, A. S. e 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.; Amaral, A.P.N.; Ribarcki, F.P.; Silveira, E.F.; Périco, E. (2007). Seasonal variations of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A. 146, 514-519.

Vinagre, A.S. (1999). Metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: efeito do jejum e da realimentação e da apedunculacão sobre a adaptação ao estresse hiposmótico. Porto Alegre: UFRGS. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Vinagre, A.S. e 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 (3): 579-583.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M. (1999). Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comp. Biochem. Physiol.** C 122, 121–129.

Weber, Roy E.; Jane W. Behrens, Hans Malte and Angela Fago (2008) Thermodynamics of oxygenation-linked proton and lactate binding govern the temperature sensitivity of O<sub>2</sub> binding in crustacean (*Carcinus maenas*) hemocyanin **Journal of Experimental Biology**. 211, 1057-1062 .

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H. Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H. (2004). Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. **Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.** 148, 1-80.

Welcomme, L. e Devos, P. (1991). Energy consumption in the perfused gills of the estuarine crab *Eriocheir sinensis* adapted to freshwater. **J.Exp.Zool.** 257, 150-159.

Wellcomme, L. e Devos, P. (1994) Immunological identification and biochemical characterization of glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas* (L). **J. Exp. Zool.** v.268, p. 218-223

Whiteley, N. M.; Taylor, E. W. and A. Haj, J. El. (1997). Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. **Journal of Thermal Biology**. Vol. 22, 419-427

Wu, Qi and Brown, M.R. (2006) Signaling and Function of Insulin-Like Peptides in Insects. **Annu.Rev.Entomol**. 24: 51:124

Zhao, Feng-Q e Keating, A.F. (2007). Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. **Current Genomics**. 8 (2), 113-128.

**TRABALHOS  
DESENVOLVIDOS**

### **1. Artigo submetido (anexo)**

Seasonality of Glucose and Neutral Amino Acid Uptake in Estuarine Crab *Neohelice Granulata*: a relationship with ambiental parameters. Valle, S.C.; Eichler, P.; Maciel, J.E.; Kucharski, L.C.; Da Silva, R.S.M. Comp. Bioch. And Physiology A. Molecular and Integrative Physiology. 2008. Article submitted.

### **2. Artigo em elaboração**

Expressão, características de ligação e atividade tirosina quinase do receptor *insulin-like* de *N.granulata*: sazonalidade

### **3 Trabalhos apresentados e resumos publicados em anais de congressos**

**3.1 Sazonalidade da ligação insulina-receptor em brânquias posteriores e músculo mandibular de *Chasmagnathus granulata*.** 1 VALLE, Sandra Costa ; MACHADO, G.; PEDROSO, Gabriela Lima ; PÖPPL, A. G. ; TRAPP, M. ; KUCHARSKI, Luis Carlos ; SILVA, Roselis Silveira Martins da .In: XXII Reunião Anual da FeSBE, 2007, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos XXII Reunião Anual da FeSBE**, 2007. p. 72-72.

**3.2 Atividade tirosina quinase do receptor insulínico e captação de aminoácidos neutros e de glicose em músculo de *chasmagnathus granulatus*: diferenças sazonais.** VALLE, S. C.; KUCHARSKI, L.; DA SILVA, ROSELIS. In: XXII Latin-American and First Ibero-american Congress of Physiological Sciences, 2006, Buenos Aires. **Physiological Mini-Reviews**. Argentina: Argentine Physiological Society, 2006. v.2. p.202 – 202

**3.3 Sazonalidade da ligação à insulina e atividade tirosina quinase do receptor insulínico em brânquias posteriores de *Chasmagnathus granulatus* (Dana 1851).** TRAPP, M. ; VALLE, S. C. ; KUCHARSKI, L. C. ; SILVA, R. S. M. In: XXII Congreso Latinoamericano y Primero Ibero-Americano de Ciencias Fisiológicas, 2006, Buenos Aires. **Physiological Mini-reviews**. Buenos Aires : Ibero-ALACF, 2006. v. 2. p. 4-4.

**3.4 Sazonalidade da ligação insulina-receptor em brânquias posteriores e músculo mandibular de *Chasmagnathus granulata*.** MACHADO, G.; VALLE, S. C., POPPL, A., KUCHARSKI, L. C., SILVA, R. S. M. In: **XVIII Salão de Iniciação Científica**. 2006.

**3.5 Atividade tirosina quinase do receptor insulínico em brânquias posteriores de *chasmagnathus granulatus*: diferenças sazonais.** MACHADO, G. VALLE, S. C.; KUCHARSKI, L.; DA SILVA, ROSELIS. In: XX Reunião Anual da FeSBE, 2005, Águas de Lindóia. **Livro de Resumos XX Reunião Anual da FeSBE**, 2005.

## **4 Publicações resultantes da participação em projetos de pesquisa**

### **4.1 Lactate Metabolism in the Muscle of the Crab *Chasmagnathus granulatus*.**

2008. MACIEL, J.E; VALLE, S.C.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Comp. Bioch. And Physiology A. Molecular and Integrative Physiology.151 61-65.

### **4.2 Efeito do Jejum e da Realimentação Sobre a Captação e a Oxidação de Aminoácidos em Tecidos do Caranguejo *Chasmagnathus Granulatus***

**Submetido Previamente à Dieta Rica Em Carboidratos Ou Proteínas.** PELLEGRINO, R. ; VALLE, S. C. ; KUCHARSKI, L. C. ; SILVA, R. S. M. Trabalho aceito na XXIII Reunião Anual da FeSBE. 2008.

**4.3 Influência do complexo hiperplasia endometrial cística - piometra na sensibilidade à insulina e predisposição à diabetes mellitus: resultados preliminares.** POPPL, A., VALLE, S. C., KUCHARSKI, L. C., SILVA, R. S. M. In: XXVIII Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, 2007, Florianópolis. **Acta Scientiae Veterinariae.** POA: 2007.

**4.4 Muscle gluconeogenesis during hypoxia and post-hypoxia recovery in *Chasmagnathus granulatus*.** DA SILVA, R. S. M. ; KUCHARSKI, L. C. ; BRUM, Ilma ; MACIEL, J. E. ; VALLE, S. DO. In: Seventh International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry, 2007, Salvador Bahia. **Comparative Biochemistry and Physiology,** 2007. v. 148 A. p. S97-S97

**4.5 Efeito da Composição da Dieta sobre o Metabolismo de lipídios em *Chasmagnathus granulatus*.** Gabriel Machado. **Trabalho de Conclusão.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007 (Co-orientação).

**4.6 Efeito da composição da dieta sobre o metabolismo de lipídios em *Chasmagnathus granulatus*.** Machado, G.S., VALLE, S. C., KUCHARSKI, L. C., SILVA, R. S. M. **XIX Salão de Iniciação Científica.** UFRGS. 2007.

**4.7 Características do receptor de insulina em amostras de músculo reto-abdominal de cadelas com hiperplasia endometrial cística – piometra.** POPPL, A., VALLE, S. C., KUCHARSKI, L. C., SILVA, R. S. M. In: **XVIII Salão de Iniciação Científica.** UFRGS. 2006.



**ANEXO**

**Seasonality of Glucose and Neutral Amino Acid Uptake in Estuarine Crab**

***Neohelice granulata*: a relationship with ambiental parameters**

Sandra Costa Valle, Paula Eichler, José Eduardo Maciel, Gabriel Machado, Luiz Carlos Kucharski, Roselis Silveira Martins Da Silva

Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Correspondence to:

Dr. Roselis Silveira Martins da Silva

Depto. de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90.050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Fax +55 51 33 08 34 53

E-mail: [Roselis@ufrgs.br](mailto:Roselis@ufrgs.br)

## **ABSTRACT**

This study investigates the mechanisms of glucose and amino acid transport in tissues from *N. granulata* collected from the natural population of the estuary. The physicochemical parameters of the estuarine environment and of hemolymph of this crustacean were determinate during different seasons of the year. In summer the the lagoon water osmolality increased (5-6 times), and the osmolality of the hemolymph decrease. In the fall, the pH of the water increased, inversely to what occurred to the hemolymph. 2-deoxi glucose (DG) uptake in gills were significantly higher than those obtained with 3-O methyl-glucose (MG) in the four seasons. Phloretin caused a remarkable reduction in DG uptake in gills; phloretin and phlorizin did not have any effect on MG uptake. The highest DG and MG uptake in gills occurs in the spring and the summer. In the jaw muscle, MG uptake in the winter and the spring was higher than DG. In the fall gills, methyl aminoisobutyricacid (MeAIB) uptake increase. In the jaw muscle, MeAIB uptake was higher in the spring. In gills and muscle from *N. granulata*, changes in glucose and amino acids uptake, and in the type of transporter are strategies to minimize seasonal oscillations in the environmental parameters of estuaries.

**KEY WORDS:** seasonality, glucose uptake, neutral amino acids, pH, osmolality, crustacean

## INTRODUCTION

*Neohelice (Chasmagnatus) granulata* is a euryhaline crab that lives in the intertidal and supralittoral zones of estuaries along the southern Brazilian coast and is exposed to many different environmental challenges during each season of the year, such as temperature, photoperiodicity, environmental O<sub>2</sub> partial pressure, food availability and composition, and salinity (Botto and Irigoyen, 1980; Turcato, 1990). *N. granulata* has a strong ecosystem engineering effect by direct and indirect effects on infauna, epifauna, marsh production and soil quality (Menone et al., 2004).

In crustaceans, glucose is one of the main energy substrates for cells, especially when there is metabolic demand such as the regulation of cell volume (Radford et al., 2005; Lorenzon et al., 2007). In several animal species glucose transport is made by the sodium cotransport system (SGLT – sodium-glucose linked transporter), by facilitated diffusion (GLUT - glucose transporter) or by both systems (Joost and Thorens, 2001; Verri et al., 2001; Kaloyianni and Doukakis, 2003; Seki et al., 2003; Villela et al., 2003; Zhao and Keating, 2007). SGLT1 have been described, and some of them cloned, in all vertebrate groups: fish, amphibians, reptiles, birds and mammals (Kipp et al., 1997; Nagata et al., 1999; Pajor et al., 1992; Garriga et al., 1999; Hediger et al., 1987; Pascual et al., 2006). In invertebrates, sodium-dependent sugar transports have been detected in mollusks, echinoderms, insects and crustaceans (Barber et al., 1979; Gerencser and White, 1980; Stewart and Bamford, 1976; Lawrence et al., 1967; Ahearn and Maginniss, 1977; Pascual et al., 2006). The GLUT-type facilitative transporters have been found in arthropods, fish, birds and mammals (Pascual et al., 2006).

In invertebrates, there are few studies on the effects of hormonal and nonhormonal factors regarding cell glucose transport by facilitated diffusion. Baker and Carruthers (1980), using crustacean muscle as a model, demonstrated that mammalian insulin increased glucose uptake and addition of phloretin to the incubation medium inhibited the transport of this hexose. Also, bovine insulin stimulates hexose transport in barnacle (*Balanus nubilis*) muscle and in *Carcinus maenas* gills (Hager and Bittar, 1985; Welcomme and Devos, 1994). In the *N. granulata* crab, Kucharski et al. (2002), using *in vitro* experiments, demonstrated that mammalian insulin stimulates glucose transport in posterior gills both during winter and summer. However, in the summer, it was necessary to use an insulin dose twice as high to achieve the same uptake effect (Kucharski et al., 2002).

The total intracellular free amino acid (FAA) concentrations are known to be directly affected by the process of cell water regulation following osmotic stress and are thus frequently used as an indicator of the capacity of a species to acclimate to saline environment (Wehner et al., 2004; Kube et al., 2007; Augusto et al., 2007). In crustaceans, the FAA concentrations in muscle, gill, hemolymph and nerve tissue participate in the osmoregulatory process in a tissue-specific manner (McNamara et al., 2004). Studies carried out with different crustacean species indicate that glycine and alanine would be the FAAs most frequently used as osmolytes to react to the osmotic stress (Shinagawa et al., 1995; Huong et al., 2001). In crustaceans, the tissue FAA concentration is around 10-13 times higher than the concentration found in mammals; and arginine, alanine, glycine, proline, glutamic acid and taurine are the most important amino acids (Gilles, 1997; Gilles and Delpire, 1997; Wehner et al., 2004). During hyperosmotic shock, the hemolymphatic levels of proteins and FAAs decrease, suggesting that the hemolymphatic and tissue proteins are hydrolyzed and the amino acids are used as cellular osmolytes in order to acclimate to the hyperosmotic environment (Wehner et al., 2004; Kube et al., 2007). On the other hand, during hypo-osmotic shock, there is a decrease in intracellular FAA, and several metabolic pathways, such as gluconeogenesis, protein and lipid synthesis, would be involved in the reduction of cellular FAA concentration (Tan and Choong, 1981; Freire et al., 1995; Dragolovich and Pierce, 1992; Okuma and Abe, 1994; Bishop et al., 1994, Oliveira and Da Silva, 2000).

Differently from glucose, amino acid transport is performed by several systems that present functional heterogeneity and a different distribution pattern in cell membrane and tissues (Guidotti and Gazzola, 1992). In mammals, the neutral amino acid transport takes place via systems A, ASC, L and N (Guidotti and Gazzola, 1992).

System A is adaptive, sodium-dependent, sensitive to changes in the electrogenic potential and transports neutral amino acids with lateral chains of different sizes (glycine, L-alanine, L-methionine, L-glutamine and L-proline), as well as methylamines (sarcosine, betaine and the nonmetabolizable MeAIB analog) (Guidotti and Gazzola, 1992; Schein et al., 2005b, Jahn et al., 2006). Amino acid transport system A appears to be subject to regulation by extracellular osmolality, and the adaptation of this system appears to be a relatively early response of cells exposed to hypertonicity (Wehner et al., 2004). In erythrocytes and hepatocytes isolated from trout (*Salmo trutta*), Gallardo et al. (1997) demonstrated that the capacity of these tissues to take up

neutral amino acids presented seasonal variation. On the other hand, in *N. granulata*'s gills, Eichler (2001) identified that the amino acid transport takes place either via system A (sodium-dependent) or via system L (sodium-independent) and that posterior gills of this crab have higher transport capacity via system A during summer.

A study carried out with *N. granulata* demonstrated seasonal variation in the use of energy reserves in the hepatopancreas and in the muscles, and the highest concentrations of glycogen in these tissues occur in the winter (Kucharski and Da Silva, 1991b). The same authors found that the hemolymphatic concentration of glucose presents higher values in the winter and in the summer (Kucharski and Da Silva, 1991b). Schein et al. (2005a;b) demonstrated that the involvement of the muscle gluconeogenic pathway in the process of osmotic regulation in *N. granulata* presents a seasonal variation. The authors verified that the capacity of the gluconeogenic pathway, the activity and the expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase enzyme in the muscle of this crab were significantly higher in the summer than in the winter (Schein et al., 2005a).

In the literature, there are few studies on crustaceans assessing glucose and amino acid transport and its possible relations with abiotic variations in the environment. Knowledge about the mechanisms of glucose and amino acid transport as a reaction to the seasonal variations of the environment contributes to clarifying the physiological, biochemical and ecological strategies used by *N. granulata* in order to occupy the estuarine environment. Therefore, the objective of the present study was to investigate the mechanisms of glucose and amino acid transport in different tissues of *N. granulata* collected from the natural population of the estuary of Tramandaí-RS-Brazil and to determine the physicochemical parameters of the estuarine environment (osmolality, water pH and temperature, and environmental temperature) and of hemolymph (osmolality and pH) of this crustacean during different seasons of the year (winter, spring, summer and fall).

## **MATERIAL AND METHODS**

### **1 Animals and Collection Procedures**

In our study, we used male crabs of the *Neohelice granulata* species (Dana, 1851 – Crustacea: Decapoda: Varunidae) in stage C of the intermolt cycle (Drach and

Tchernigovzeff, 1967). Animals were collected from the natural population of the eastern shore of Lagoa de Tramandaí (29°58' South latitude and 58°08' West longitude) in the municipality of Imbé, Rio Grande do Sul, Brazil. This environment is typically estuarine, being partially covered with halo-hydrophilic vegetation, and the water level is influenced by the wind. Therefore, the region can be flooded by creeks that drain rainwater from the coastal plain and by waters from the Atlantic Ocean. The O<sub>2</sub> concentration dissolved in the water ranges between 2.78 to 11.78 mg O<sub>2</sub>/L.

During 2 years (from fall 2005 to summer 2007), in each season, about 20 animals were manually collected from the sandy-muddy soil from under the water or from their burrows. Then, they were taken to the laboratory inside plastic boxes containing water collected at the site. After that, the animals remained 24 hours in open environment containing water from the collection site (Lagoa Tramandaí), with constant aeration and exposed to temperature and photoperiod according to each season of the year in order to recover from the stress caused by collection and transportation.

During collection, the environmental temperature and the temperature of the water in the lagoon's shore (up to 0.5 m depth) were measured. Water samples were also collected so that pH and osmolality could be measured. Immediately after collection, the lagoon's water and hemolymph (removal of the articulation between the 4th and 5th pereopod) were used to determine osmolality (vapor pressure osmometer Wescor 5520, Logan, UT, USA) and pH measure (Phtek Ph53B).

## **2 Experimental Procedures**

Before the experiments, hemolymph was collected in order to determine hemolymph glucose levels, and only those animals with glucose levels similar to those at the time of collection were used in the study.

Each animal, after being anesthetized by chilling (for 15 minutes), had its carapace and jaw removed, and also had the tissues excised and used in the different experimental procedures. To assess the uptake of glucose and neutral amino acids each incubation was performed with 5-6 animals/season/year (winter: June, July, August; spring: September, October, November; summer: December, January, February; autumn: March, April, May). The last three anterior and posterior gills and the jaw

muscle were used. In the case of gills, the chitin cuticle was cut off and the tissues were immediately rinsed in an ice-chilled incubation buffer.

## **2.1 Incubation and Radioactivity Measurement**

Specimens of muscle ( $\pm 50\text{mg}$ ) and of anterior and posterior gills ( $\pm 100\text{mg}$  of each) were incubated in  $500\mu\text{l}$  of physiological solution containing  $400\text{ mM NaCl}$ ,  $10\text{ mM KCl}$ ,  $25\text{ mM CaCl}_2$ ,  $10\text{ mM MgCl}_2$ ,  $8.8\text{ mM H}_3\text{BO}_3$ ,  $10\text{ mM HEPES}$ ,  $0.1\text{ mM}$  phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.8 with osmolality of  $815\text{ mOsm/Kg}$ , supplemented with  $0.2\ \mu\text{Ci}$  of  $1\text{-}[^{14}\text{C}]$  2-deoxy-D-glucose ( $39\text{mCi / mmol}$ , Amersham),  $0.2\ \mu\text{Ci}$  of  $3\text{-O-}[^{14}\text{C}]$  methyl-D-glucose ( $53\text{mCi/mmol}$ , Amersham) or  $0.2\ \mu\text{Ci}$  of  $1\text{-}[^{14}\text{C}]$  MeAIB-methyl aminoisobutyric acid ( $250\text{ mCi/mmol}$ , Du Pont). After 120 min of incubation, the tissue specimens were removed from the medium, rinsed twice in chilled physiological saline (so as to remove excess radioactivity from the tissue), blotted with filter paper and placed in screw-capped vials containing  $1\text{ml}$  of distilled water. After that, the vials were frozen and boiled three times in a row to disrupt the cells and release the amino acids or the glucose taken up by the cells. The released content was regarded as the internal medium, and the incubation medium, as the external medium.

A total of  $100\mu\text{l}$  of internal medium or external medium was extracted from each sample and placed in toluene-Triton X-100 (2:1, v/v) –PPO 0.4%-POPOP 0.01%, and radioactivity was measured in the liquid scintillation spectrometer (LKB Wallac scintillation Counter). The results were expressed as tissue/medium (T/M) ratio, i.e.,  $\text{cpm / ml}$  of tissue fluid divided by  $\text{cpm / ml}$  of the incubation medium.

## **2.2 Effect of the sodium-free medium, of phloretin and of phlorizin on glucose transport in anterior and posterior gills.**

Approximately 20 *N.granulata* crabs collected in spring and summer, acclimated to laboratory conditions (salinity of  $20\text{‰}$ , constant oxygenation and *ad libitum* beef diet for 10 days) were used to investigate the specificity of glucose transport systems in anterior and posterior gills. Tissue specimens were incubated in the presence of facilitated diffusion glucose transporter inhibitor (phloretin,  $1\text{mM}$ ) or sodium-dependent



glucose transporter inhibitor (phlorizin, 1mM). Tissues were also incubated in a sodium-free medium. Other incubation conditions and the glucose uptake measurements were the same ones described in item 2.1. In the case of the sodium-free physiological solution, sodium chloride was replaced with choline chloride and the osmolality and pH were the same as those of the solution described in item 2.1.

### 3 Statistical Analysis

The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean (SDM). Of the experimental data obtained, the comparison between two points was made using Student's t test for unpaired data. The comparison between seasons was made using the one-way analysis of variance (ANOVA), with Student- Newman- Keuls (SNK) comparison test. The differences between the means were significant when  $p \leq 0.05$ . Statistical analyses were performed with Sigma Stat for Windows, version 2.0.

## RESULTS

Table 1 shows the osmolality (mOsm / Kg H<sub>2</sub>O) and pH ( $-\log [H^+]$ ) values of the water and of the hemolymph, and the air and water temperatures ( $^{\circ}C$ ) were recorded during the different seasons throughout the years assessed in this study. The osmolality of the lagoon water was 5-6 times higher ( $p > 0.05$ ) in the summer than that observed in the other seasons. However, due to the wide variation within seasons, no statistical difference was observed.

The osmolality of the hemolymph of *N.granulata* was lower in the summer ( $p \leq 0.05$ ) than in the winter, spring and fall.

In the fall and winter, the estuary's water had greater pH values ( $p \leq 0.05$ ) than those obtained during spring and summer. In the fall, the pH of the water increased ( $p \leq 0.05$ ), inversely to what occurred to the hemolymph pH during the same season.

Ambient temperature ranged from  $18.5 \pm 0.7$   $^{\circ}C$  in the winter to  $32 \pm 2.8$   $^{\circ}C$  in the summer. The water temperature, measured at approximately 0.5 m from the shore, did not change significantly as did the air temperature. During collections, it was observed that *N. granulata* crabs remained in their burrows and were not found in the aquatic environment in the presence of rain, strong winds, high tide and extremely high ( $\geq 35^{\circ}C$ ) or low ( $\leq 15$   $^{\circ}C$ ) temperatures. These factors in isolation or in association prevented the collection of animals under these circumstances.

Fig. 1 shows that the D-glucose (DG) uptake values in posterior gills were significantly higher than those obtained with methylglucose (MG) in the four seasons, showing a twofold increase in the winter and in the summer.

DG uptake in posterior gills begins to increase in the winter and in the spring, reaching maximum values in the summer ( $p \leq 0.05$ ). In posterior gills, MG uptake was significantly higher in the spring and in the summer, decreasing in the fall and in the winter.

In anterior gills, DG uptake was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than that of MG in the winter, summer and fall. In addition, DG uptake increased in the summer ( $p \leq 0.05$ ) as opposed to the other seasons. On the other hand, MG uptake increased only in the spring ( $p \leq 0.05$ ), yielding similar values in the winter, summer and fall (Fig. 2).

In the jaw muscle of crabs collected in the fall, DG uptake was higher ( $p \leq 0.05$ ) than that observed for MG (Fig.3); however, MG uptake in the winter and in the spring was nearly 17% higher ( $p > 0.05$ ) than that obtained for DG (Fig.3). In the spring and fall, there is an increase ( $p \leq 0.05$ ) in DG uptake comparatively to that which is obtained in the winter and in the summer (Fig.3). When MG was used, there were higher T/M values in the spring and in the winter ( $p \leq 0.05$ ) than those obtained for the summer and fall (Fig.3).

Figure 4 shows the seasonal variation in the hemolymph glucose concentration of *N. granulata*, which is 64 to 39% ( $p \leq 0.05$ ) higher in the summer than in the spring, fall and winter, respectively.

Table 2 reveals that DG uptake was higher ( $p \leq 0.05$ ) in posterior gills in the sodium-free medium than in the control medium. The presence of phloretin (1mM) caused a remarkable reduction in DG uptake in anterior and posterior gills of *N. granulata* (Table 2).

According to Table 2, MG uptake values were lower ( $p \leq 0.05$ ) both in the control and sodium-free media than those obtained for DG. Nevertheless, the use of 1mM of phloretin and phlorizin inhibitors did not have any effect on MG uptake by anterior and posterior gills (Table 2).

No significant variations were observed in MeAIB uptake in posterior and anterior gills across winter, spring and summer months. In the fall, MeAIB uptake values increase significantly ( $p > 0.05$ ) as opposed to those obtained for the other three seasons (Fig. 5 A and B). In the jaw muscle, MeAIB uptake was 50% higher ( $p \leq 0.05$ )

in the spring than in the winter, summer and fall (Fig.5 C). In the summer and fall months, there is a gradual decrease in MeAIB uptake (Fig. 5C).

## DISCUSSION

Among the physicochemical parameters analyzed, water osmolality showed the largest annual variation; however, hemolymph osmolality changed only in the summer. In crustaceans, osmoregulatory capacity played a key role in the development and in the conquest of the estuarine habitat (Bromberg, 1992). Euryhaline species, such as *N. granulata*, can withstand large variations in salinity, with minimum changes in the osmotic concentration of the hemolymph (Castilho et al., 2001). Several studies of *N. granulata* have shown that this species is capable of hyperosmoregulation in low salinities and hypo-osmoregulation in high salinity (Bianchini et al., 2008) and its isosmotic point ranges between 28.5‰ and 30‰, in the winter and summer, respectively (Bromberg, 1992; Luquet et al., 2005; Bianchini et al., 2008). An important seasonal difference in salinity tolerance and osmotic and ionic regulation between adult male and female *N. granulata* was observed (Novo et al., 2005). Females show larger and faster variations in osmolality and ion concentrations after 2 days of hypo-osmotic stress in the winter than in the summer, while males have an opposite response. Furthermore, males achieve the hemolymph osmotic and ionic steady state faster after the hyperosmotic stress in the winter than in the summer (Novo et al., 2008). The results for the seasonal variation in environmental salinity and its relationship with the osmolality of the hemolymph evince that the compensatory mechanisms of osmotic adjustment of *N. granulata* are extremely dynamic. Bianchini et al. (2008) suggest that seasonal differences in the response to environmental changes in salinity in *N. granulata* are due to changes in ionic permeability and active transport associated with seasonal changes in lipid composition and physiology at the gills.

In the winter and fall, when environmental temperature decreases, there is a marked increase in water pH values. However, there was a significant decrease in the pH values of the hemolymph only in the fall, whereas they remained unchanged in the other seasons. In other crustaceans, similar results were found correlating environmental and hemolymphatic pH values with water temperature (Whiteley et al., 1997).

In crustaceans, hemolymph pH and temperature alter the affinity and cooperativity of hemocyanine and O<sub>2</sub> (Bohr effect) (Johnson et al., 1984; 1988; Weber et al., 2008). Therefore, for *N. granulata*, maintenance of pH at 7.6-7.7 with low

environmental temperature, such as the one observed in the fall, would increase the affinity of hemocyanine for O<sub>2</sub>, reducing the supply of oxygen to the tissues, in a period of the year in which the animal is still in physical activity in its habitat. Nonetheless, with a reduction in hemolymph pH to 7.1 the affinity of hemocyanine for O<sub>2</sub> decreases, minimizing the effect of low environmental temperature on the affinity of hemocyanine for O<sub>2</sub>, thus maintaining the adequate supply of oxygen to the tissues. In the fall, environmental osmolality diminishes considerably comparatively to the summer, increasing the oxygen consumption rate of *N. granulata* due to its attempt of acclimation to environmental salinities (Bianchini and Castilho, 1999). Recently, in *Carcinus maenas*, it has been demonstrated that pH and temperature alter the saturation curve of hemocyanine (Bohr effect) (Weber et al., 2008). The authors show that the affinity of hemocyanine for O<sub>2</sub> increases at pH 7.8 and that there is no significant difference when the temperature increases from 10°C to 20°C. However, at pH 7.0, the temperature of 20°C substantially reduces affinity, unlike what occurs at 10°C (Weber et al., 2008). Moreover, pH changes in the extracellular fluid may affect the tertiary protein structure, reducing the binding affinity of these compounds, modifying several cellular systems, such as the transport of molecules across the plasma membrane and the enzyme activity (Weber et al., 2008).

In its habitat, *N. granulata* is exposed to a wide range of ambient temperatures whose extremes vary from 18.5 °C ± 0.6 to 32 ± 2.8 °C in the winter and summer, respectively. In the winter, despite the low temperature, hemolymph pH averages 7.6. This season also influences the behavior of animals and, in general, crabs are found in their burrows in the winter and on the lagoon surface in the summer. This seasonal variation in the behavior of *N. granulata* had already been reported (Botto and Irigoyen, 1980; Turcato, 1990) and contributes to attenuating the extreme temperatures and the adversities of the environment. Therefore, since the animal remains in its burrow in the winter, the necessity of oxygen supply to the tissues is reduced. Thus, *N. granulata* maintains a pH of 7.6 despite the low environmental temperature.

Posterior gills have been suggested to be involved in both hyper- (salt uptake) and hyporegulation (salt secretion) in *N. granulata*, since they are mostly lined with a thick tissue, showing the basic characteristics of a salt-transporting epithelium (Genovese et al., 2000; Bianchini et al., 2008). During the process of acclimation to the osmotic stress, the posterior gill tissue probably consumes the highest amount of energy

since it is in charge of the isosmotic regulation of the extracellular fluid, as well as the anisosmotic regulation of the intracellular fluid (Gilles and Delpire, 1997; Luquet et al., 2000; Novo et al., 2005; Bianchini et al., 2008).

These organs show marked structural, biochemical and physiological changes according to environmental salinity, resulting in an active NaCl uptake in crabs acclimated to low salinity; however, mechanisms involved in crabs acclimated to high salinity are much less understood (Bianchini et al., 2008). Bianchini et al. (2008) suggest that hyporegulation would be achieved by active secretion of both Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>, which would involve a higher expression of the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter in the salt-transporting epithelium of the posterior gill. Also, the gills are constantly in direct contact with the external environment and so they are the first to suffer the seasonal variations in environmental parameters.

In crustaceans, glucose is one of the major energy sources for metabolic adjustments during osmoregulation (Oliveira e Da Silva, 1997; 2000). Thus, in the plasma membranes of posterior gills, glucose transport by facilitated diffusion can be a strategy, as sodium-dependent glucose uptake would interfere in the process of uptake or secretion of this ion, which is necessary for the acclimation of this crab to the seasonal and circadian variations of water salinity or during emersion when water evaporates, increasing the salt concentration in the gill chamber (Luquet and Ansaldo, 1997; Bianchini et al., 2008). Biochemical and molecular evidence indicates the involvement of the gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase in active Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> uptake and secretion taking place at the posterior gills of hyper- and hypo-osmoregulating *N. granulata* (Castilho et al., 2001; Schleich et al., 2001; Luquet et al., 2005).

In *N. granulata*, the three anterior gill pairs seem to specialize in respiration and active excretion of ammonia. However, during acclimation to extreme environmental salinities, oxygen consumption increases, which enhances the activity of gas transport and active excretion of ammonia to anterior gills (Bianchini and Castilho, 1999; Bianchini et al., 2008), thus boosting the energy needs of this organ.

In the present study, DG uptake was markedly higher than that of MG in posterior and anterior gills of *N. granulata* in all seasons. In the posterior and anterior gills of *N. granulata* acclimated to laboratory conditions, DG uptake was around 50% higher than the MG uptake. Phloretin (GLUT-type transporter inhibitor) substantially inhibited DG uptake by posterior and anterior gills; however, incubation in sodium-free medium did not reduce the DG uptake. Also, MG uptake was not inhibited in the

sodium-free medium or by the presence of phlorizin (sodium-dependent glucose transporter inhibitor), suggesting that MG transport by the gills of *N. granulata*, observed in this study, probably occurs via GLUTs. In vertebrates, Hediger and Rhoads (1997) showed that MG transport can also occur via GLUTs. Wellcomme and Devos (1994) demonstrated the presence of GLUT 4 in gills of *Carcinus maenas*. GLUT-type facilitative transporters have been found in other arthropods. Pascual et al. (2006) show that the absorption of galactose in gastric caeca of *Locusta migratoria* is mediated by GLUT-type facilitative transporters. Conversely, in gills of *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*, Pajor et al. (1992) found a sodium-dependent glucose transport system.

The highest DG and MG uptake in posterior and anterior gills occurs in the spring and in the summer, when air and water temperatures are high. In the spring and in the summer, animals change habitats more frequently and are found in their burrows, in the water, or on land, depending on the time of the day. Therefore, the increase in DG and MG uptake by posterior and anterior gills occurs in seasons in which the physical activity of these crabs is more intense and in which the necessity for energy substrates is also higher. Also in the spring and in the summer, *N. granulata* takes advantage of greater food availability and restores its energy reserves spent during the winter months (Kucharski and Da Silva, 1991). According to D’Incao et al. (1988), *N. granulata* shows a seasonal variation in its gastric contents: in the fall and in the winter, there is a predominance of vegetable sediments and remains; in the spring, there is an increase in the frequency of foods of animal origin; in the summer, there is a balance between the three food components. The highest glucose concentration in the hemolymph of this crab is found in the summer (Kucharski and Da Silva, 1991b). In addition, the lowest water osmolality occurs in the spring and the highest one in the summer, thus *N. granulata* goes from a hypo-osmotic medium to a hyperosmotic one. Several studies on this crab species demonstrated the participation of carbohydrate metabolism in the metabolic adjustment, which is necessary for the acclimation to the hypo-osmotic and hyperosmotic environment and that this metabolic response varies from season to season (Nery and Santos, 1993; Schein et al., 2005a). Nery and Santos found out that induced hyperosmotic stress in the summer increased carbohydrate levels in gills (Nery and Santos, 1993). All these findings corroborate the increase in glucose uptake by gills in the spring and summer months, when important environmental, behavioral and metabolic changes take place in *N. granulata*, after a period of low physical and metabolic activity during the winter months.

Unlike gills, the muscle of *N. granulata* is less exposed to seasonal variations in environmental parameters. Nevertheless, the muscle acts an energy reserve site whose glycogen and lipid concentrations vary from season to season (Kucharski and Da Silva, 1991, Nery and Santos, 1993; Luvizzoto-Santos et al., 2003). In addition, muscle gluconeogenesis participates in metabolic adjustment during the acclimation of *N. granulata* to the hypo-osmotic and hyperosmotic stress and this response varies seasonally (Schein et al., 2005a;b).

Differently from what occurred with the gills, no remarkable differences were observed between DG and MG uptake by the muscle in the winter, spring and summer months. Given the results obtained in the present study, it is possible to infer that there are two glucose transport systems in the muscular tissue with different kinetic and modulatory properties: via GLUTs and via sodium cotransport. Ahearn and Clay (1988) demonstrated a sodium-dependent glucose uptake in the hepatopancreatic epithelial brush border membrane vesicles of lobsters. Since the muscle is not involved in ionoregulation in *N. granulata*, the presence of sodium-dependent glucose transport system in the muscle, unlike that of gills, does not interfere with the uptake or excretion of sodium necessary for acclimation to extreme environmental salinities.

In the fall, MG uptake by the muscle was approximately 61% lower than that of DG. In the fall, there is a significant increase in water pH and a remarkable reduction in hemolymph pH (pH 7.1). It was shown that cell permeability of the red cells of the frog *Rana balcanica* to sodium and potassium ions depends on extracellular pH; in acid pH, there is an increase in sodium uptake and in potassium loss by the cells. Thus, a change in the cellular electrogenic potential may compromise the activity of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pump (Kaloyianni and Doukakis, 2003; Wehner et al., 2004). Therefore, the reduction in hemolymph pH may interfere with the sodium-dependent glucose transport system in the muscle in the fall months, and glucose uptake by facilitated diffusion is then predominant. In the hepatopancreatic epithelial brush border membrane vesicles of lobsters, low luminal pH stimulated glucose transport by increasing affinity of the carrier mechanism for the sugar (Ahearn and Clay, 1988). In *L. migratoria*, the galactose transport via Glut-type facilitative transporters in the gastric caecae was not affected by different pH (from 4.2 to 8.2) (Pascual et al., 2006).

The present study shows a marked reduction in DG and MG uptake by the muscle in the summer months. This reduction in glucose uptake can be partially explained by the low glycogen concentration in this tissue in the summer months

(Kucharski and Da Silva, 1991b). In the summer, there was a considerable increase in hemolymph glucose concentration. The highest hemolymph glucose concentration in the summer may be the result of higher food intake or lower peripheral use of this hexose. Schein et al. (2005a) found that the capacity of the muscle for synthesizing  $^{14}\text{C}$  glucose from  $^{14}\text{C}$  alanine and the activity and expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK 4.1.1.32) increase in the summer as opposed to the winter. Thus, in the summer, the increase in glucose concentration can also result from the increase in glucose production by the tissue with a possible decrease in glucose uptake by the two transport systems.

As in many other invertebrates, the determination of free amino acids in the hemolymph of *N. granulata* maintained at a salinity of 20 ‰ revealed the presence of essential and non-essential amino acids, with the most abundant free amino acids being glycine, serine, arginine, alanine and proline (Schein, 1999). During hyperosmotic stress, hemolymph glycine concentration decreases 60% in *N. granulata*. On the other hand, during hypo-osmotic stress, the circulating levels of this amino acid increases by 200 hundred times (Schein et al., 2005b).

The nonmetabolizable MeAIB analog, which is taken up by the cells via sodium-dependent system A, was used in the present study (Guidotti and Gazzola, 1992; Schein, et al., 2005b; Jahn et al., 2006).

It was demonstrated that in crustaceans the gill tissue has the largest capacity for protein synthesis, followed by the hepatopancreas, muscle and heart (Lyndon and Houlihan, 1998). In the present study, the highest MeAIB uptake by gills (in the fall) was approximately 1.8 times greater than that observed in the muscle (in the spring). In *Mytilus edulis*, the gill is responsible for 70% to 80% of the uptake of amino acids from the seawater into the deeper tissues of the body (Rice and Stephens, 1988).

The seasonal assessment of the MeAIB analog uptake showed that there was an increase in transport in posterior and anterior gills of *N. granulata* via system A only in the fall. In vertebrates, an important feature of system A is that it is the major amino acid carrier system subject to regulation by environmental conditions and extracellular osmolality (Guidotti and Gazzola, 1992). In the fall, there is a sharp decrease in ambient temperature and in water osmolality of the habitat. Therefore, the increase in MeAIB uptake by anterior and posterior gills in the fall may be influenced by environmental factors and by the extracellular fluid. In hyper-regulating species such as *N. granulata*,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and carbonic anhydrase are the main enzymes involved in active ion



transport from hypo-osmotic ambient across the gills (Péqueux, 1995; Viatale et al., 1999; Castilho et al., 2001). Short-term increases in enzyme activity are reported to be related to the stimulation of pre-existing enzyme units, while long-term increases are associated with synthesis of new enzymatic units (Lucu, 1990). The increase in amino acid uptake by gills in the fall can increase enzyme synthesis, which would allow for the acclimation of *N. granulata* to the hypo-osmotic environment in the fall, winter and spring. A study conducted with male and female *N. granulata* suggests that acclimation to hypo-osmotic stress would be dependent on the crab's ability to activate protein synthesis (Novo et al., 2005). The authors also suggest that 15 days of acclimation to laboratory conditions was not enough to eliminate seasonal effects of the acclimation process on osmotic and ionic regulations in *N. granulata* occurring in the field (Novo et al., 2005). The seasonal differences in *N. granulata*'s response to environmental salinity changes are associated with seasonal changes in lipid composition and physiological strategies found in the gills (Bianchini et al., 2008).

In the muscle, the larger MeAIB uptake occurs in the spring, decreasing gradually in the summer and fall. In the spring, there is a remarkable elevation in air and water temperatures after the low temperatures of winter. Also in the spring, we have the lowest water osmolality values in Lagoa Tramandaí. Schein et al. (2005a) demonstrated an increase in glucose synthesis from  $^{14}\text{C}$ -alanine and in the activity of PEPCCK during the acclimation to hypo-osmotic stress in the summer in the jaw muscle of *N. granulata*. The intracellular amino acids in the muscle could be deaminated and the carbon chains could be used as substrates for the gluconeogenic pathway. Schein et al. (2005a) showed that gluconeogenesis is one of the pathways implicated in the metabolic adjustment during hypo-osmotic shock in *N. granulata*. In the spring, the animals increase their activity, since the reproductive stage begins and hemolymph glucose concentrations are still low comparatively to the summer. The increase in glucose production via gluconeogenesis is favorable to the osmoregulatory, reproductive and exploratory processes that take place in this season.

The muscular tissue has a different pattern of neutral amino acid transport from the gills. In this tissue, hypo-osmolality observed in the fall and winter did not change the rate of neutral amino acid uptake; however, in the spring, there was a remarkable increase in these rates via system A. Previous studies show that the muscular tissue has a different metabolic response pattern from that of gills and of the hepatopancreas in several experimental conditions (hypoxia, anoxia, hypo-hyperosmotic stress) (Schein et

al., 2005b; Pelegrino et al., 2008; Maciel et al., 2008). In the two years investigated in this study the lowest water salinity values were observed during the winter and spring, however, the largest change within the season occurred in the winter. Schein et al. (2005b) showed that the gluconeogenic capacity and the expression and activity of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK 4.1.1.32) are markedly lower in the winter than in the summer. In the spring, the increase in neutral amino acid uptake may occur in response to the activation of the gluconeogenic capacity in the months in which the temperature is higher, as pointed out by Schein et al. (2005b). This evidence the role of muscle in the maintenance of circulating levels of energy substrates and under osmotic regulation conditions, as described in other studies (Schein et al., 2005b; Pelegrino, 2006; Maciel et al., 2008).

In conclusion, *N. granulata* withstands seasonal, circadian or tidal changes in temperature, salinity and water pH by way of behavioral, physiological and biochemical strategies. Changes in the capacity of glucose uptake and in the type of glucose and amino acid transporters in gills and muscle are strategies used by *N. granulata* to minimize seasonal oscillations in the environmental parameters of estuaries.

## REFERENCES

- Ahearn, G.A., Maginniss, L.A. 1977. Kinetics of glucose transport by the perfused mid-gut of the freshwater prawn *acrobrachium rosenbergii*. J.Physiol. 271, 319–336.
- Augusto, A; Greene, L.J.; Laure, H.J. and McNamara, J.C. 2007. The Ontogeny Of Isosmotic Intracellular Regulation in The Diadromous, Freshwater Palaemonid Shrimps, *Macrobrachium Amazonicum* and *M. Olfersi* (Decapoda). Journal of Crustacean Biology, 27(4): 626–634.
- Baker, P.F. and Carruthers, A. 1980. Insulin stimulates sugar transport in giant muscle fibers of barnacle. Nature. 286, 276-279.
- Barber, A., Jordana, R., Ponz, F. 1979. Competitive kinetics of sugar active transport in snail intestine. Rev. Esp. Fisiol. 35, 243– 248.

Bianchini, A., Castilho, P.C. 1999. Effects of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62, 63–69.

Bianchini, A.; Lauer, M.M; Nery, L.E.M.; Colares, E.P.; Monserrat, J.M.; Santos Filho, E. A. 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during acclimation. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. Article in press. DOI 10.1016

Bishop, S.H.; Greenwalt, D. E.; Martin, A.K., Paynter, K.T. Ellis, L.L. 1994. Metabolic regulation of proline, glycine and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. J. Exp. Zool., 268, 151-161.

Botto, J.L. e Irigoyen, H.P. 1980. Bioecologia 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. Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimento Plataf. Cont. Atlant Sur, UNESCO-Montevideo, p.161-169.

Bromberg, E. 1992. Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão. Master thesis, Universidade de São Paulo. São Paulo. Brazil.

Castiglioni, D.; Oliveira, G.T.; Bond-Buckup, G. 2006. Dinâmica do desenvolvimento das gônadas de *Parastacus varicosus* (Crustácea, Decapoda, Parastacidae). Iheringia, Ser. Zool. 96 (4), 413-417.

Castilho, P.C.; Martins, I.A. Bianchini, A. 2001. Gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). Journal of experimental Marine Biology and Ecology. 256, 215-227.

Charmantier – Dauers M., Charmantier G., Janssen K.P.C., Aiken D.E., Van Herp F. 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. Gen Comp Endocrinol 94, 281-293.

Chittó, A. 2006. Estudo do Metabolismo de carboidratos e lipídios em tecidos de caranguejos *Neohelice granulata* (Dana, 1851) submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. POA-RS-Brasil.

D’Incao, F. Ruffino, M.L.; Silva, K.G.; Braga, A. C. 1990. Habito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851(decapoda grapsidae) na barra de Rio Grande, RS. Atlântida. 12 (2), 85-93.

Drach, F. and Tchernigovtzeff, C. 1967 Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. Vie Milieu, 161: 595-607.

Dragolovich, J, Pierce, S.K. 1992. Comparative time courses of inorganic and organic osmolyte accumulation as horseshoe crabs (*Limulus-polyphemus*) adapt to high salinity. Comp. Bioch. and Physiol. A-Physiology 102 (1), 79-8.

Eichler, P. Transporte de glicose e aminoácidos nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). 2001. Master Thesis. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. POA-RS-Brasil.

Freire, C.A., Mcnamara, J.C. e Rosa, J.C., Greene L.J. 1995. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). Free amino-acid concentrations in the hemolymph.. Gen. Comp. Endocr., 100(1), 83-91.

Gallardo, M.A.; Cannals, P.; Albi, J.L.; Pesquero, J.; Sanchez, J. 1997. Seasonal variation in uptake of short-chain neutral amino acid by red blood cells and hepatocytes in trout (*Salmo trutta*). J. Exp. Biol. 200, 2781-2787.

Garriga, C., Moreto, M., Planas, J.M. 1999. Hexose transport in the apical and basolateral membranes of enterocytes in chickens adapted to high and low NaCl intakes. J. Physiol. 514, 189–199.

Gebauer, P.; Paschke, K; Anger, K. 2004. Stimulation of metamorphosis in an estuarine crab, *Neohelice granulata* (Dana, 1851): temporal window of cue receptivity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 311, 25-36.

Genovese, G; Luchetti, C G; Luquet, C M. 2004 Na/K ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Neohelice granulata* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. Marine Biology 144: 111-118.

Gerencser, G.A., White, J.F. 1980. Membrane potentials and chloride activities in epithelial cells of *Aplysia* intestine. Am. J. Physiol. 239, 445– 449.

Gilles, R. 1997. Effects of osmotic stress on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. Comp Bioch Physiol 56 A, 109

Gilles, R. and Delpire, E. 1997. Variations in salinity, osmolarity and water availability: Vertebrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed.). Handbook of Comparative Physiology. Oxford University Press, New York,. p. 1523-1586.

Guidotti, G.G. and Gazzola, G. In: Kilberg, M.S. and Häussinger, D. 1992. Mammalian Amino Acid Transport. Mecanisms and Control. Plenum Press. New York, New York.

Hager, S.R. and Bittar, E.E. 1985. Hormones and barnacle muscle fiber as a preparation. *Comp. Biochem. Physiol.* 99, 215-218.

Hediger, M.A. and Rhoads, D.B. 1997. Molecular Physiology of sodium-glucose co-transporters. *Physiological Reviews.* 74, 993-1026.

Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., Wright, E.M. 1987. Expression cloning and cDNA sequencing of the Na<sup>+</sup>/glucose co-transporter. *Nature.* 330, 379– 381.

Huong, D.T.T., Yang, W., Okuno, A., Wilder, M.N. 2001. Changes in free amino acids in the hemolymph of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities: relationship to osmoregulatory ability. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128, 317–326.

Jahn, M.P.; Cavagni, G.M.; Kaiser, D.; Kucharski, L.C. 2006. Osmotic effect of choline and glycine betaine on the gills and hepatopancreas of the *Chasmagnathus granulata* crab submitted to hyperosmotic stress. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 334, 1-9.

Jeckel, W. H.; Demoreno, J. E. A.; Moreno, V. J. 1991. Seasonal variations in the biochemical composition and lipids of digestive gland in the shrimp *Pleoticus muelleri* Bate. *Comp. Biochem. Physiol., B* 98: 253-260.

Johnson, B. A.; Bonaventura, C. and Bonaventura, J. 1984. Allostery in *Callinectes sapidus* Hemocyanin: Cooperative Oxygen Binding and Interactions with L-Lactate, Calcium, and Protonst. *American Chemical Society.* 23, 872-878.

Johnson, B. A.; Bonaventura, C. and Bonaventura, J. 1988. Allostery in *Callinectes sapidus* Hemocyanin: Cooperative Oxygen Binding and Interactions with L-Lactate, Calcium, and Protonst. *Biochemistry* 27, 1995-2001.

Joost, H.G. and Thorens, B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.* 18 (4), 247-56.

Jun Xu, Y. and Wu, K. 2006. Seasonality and interannual variability of freshwater inflow to a large oligohaline estuary in the Northern Gulf of Mexico. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 68, 619-626.

Kaloyianni, M. and Doukakis, I. 2003. Effect of Adrenaline on Glucose Transport in Red Cells of *Rana balcanica*. *Gen. Physiol. Biophys.* 22, 69-80.

Kipp, H., Kinne-Saffran, E., Bevan, C., Kinne, R.K. 1997. Characteristics of renal Na<sup>(+)</sup>-D-glucose cotransport in the skate (*Raja erinacea*) and shark (*Squalus acanthias*). *Am. J. Physiol.* 273, 134–142.

Kube, S.; Sokolowski, A.; Jansen, J.M.; Schiedek, D. 2007. Seasonal variability of free amino acids in two marine bivalves, *Macoma balthica* and *Mytilus spp.*, in relation to environmental and physiological factors. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* 147, 1015-1027.

Kucharski, L.C., Schein, V., Capp, E. 2002. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen Comp Endocr* 125 (2): 256-263.

Kucharski, LC; Da Silva, RSM. 1991a. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *C. granulata* (Dana 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 99A, 215-218.

Kucharski, LC; Da Silva, RSM. 1991b. Seasonal Variations in the energy Metabolism in estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Com. Biochem. Physiol. A.* 100 (3), 599-602.

Lawrence, A.L., Lawrence, D.C., Greer, M.L., Mailman, D. 1967. Intestinal absorption in the sea cucumber, *Stichopus parvimensis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 20, 619–627.

Lorenzon, S.; Giulianini, P.G.; Martinis, M.; Ferrero, E.A. 2007. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in American lobster *Homarus americanus*. *Biochemistry and Physiology, Part A*. 147, 94-102.

Lucu, C., Towle, D.W. 2003. Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135, 195–214.

Luquet, C.M., Ansaldo, M. 1997. Acid-base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 117, 407–410.

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* 73: 53-67.

Luquet, C.M.; Postel, U.; Halperin, J.; Urcola, M.R.; Marques, R. and Siebers, D. 2002. Transepithelial potential differences and Na<sup>+</sup> flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. *J. Exp. Biol.* 205, 71-77.

Luquet, C.M., Weihrauch, D., Senek, M., Towle, D.W. 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *J. Exp. Biol.* 208, 3627–3636.

Luvizzotto-Santos R.; Lee, J. T.; Branco, Z. P. Bianchini, A. e Nery, L. E. M. 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea – Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295A: 200-205.



Lyndon, A. R. and Houlihan, D. F. 1998. Gill Protein Turnover: Costs of Adaptation Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology. Vol. 119 (1) 27-34.

Maciel, J.E; Valle, S.C.; Kucharski, L. C.; Da Silva, R. S. M. 2008. Lactate Metabolism in the Muscle of the Crab *Chasmagnathus granulatus*. Comp. Bioch. And Physiology A. Molecular and Integrative Physiology. 151, 61-65.

Marquese, A., Kucharski, L.C.; Da Silva. 2006. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 332, 198-205.

McNamara, J.C., Rosa, J.C., Greene, L.J., Augusto, A., 2004. Free amino acids pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 37, 193–208.

Menone, M. Miglioranza, K., Iribarne, O., Aizpún de Moreno, J., Moreno, V. 2004. The role of burrowing beds and burrows of the SW Atlantic intertidal crab *Chasmagnathus granulata* in trapping organochlorine pesticides. Marine Pollution Bulletin 48, 240–247.

Nagata, K., Hori, N., Sato, K., Ohta, K., Tanaka, H., Hiji, Y., 1999. Cloning and functional expression of an SGLT-1-like protein from the *Xenopus laevis* intestine. Am. J. Physiol. 276, 1251– 1259.

Nery, L.E.M; Santos, E.A.; Bianchini, A.; Gonçalves, A.A. 1993. Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. Brazilian J. Med. Biol. Res. 26:1291-1296.

Novo, S.; Miranda, R.B. and Bianchini, A. 2005. Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Neohelice granulata*

(Crustacea, Decapoda). 2005. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 323, 118-137.

Okuma, E, Abe, H. 1994. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A(1), 191-197.

Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C., Da Silva, R. S. M. 2004a. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *J. Exp. Zool.* 301A, 240-248.

Oliveira, G. T.; Rossi, I. C.; Kucharski, L. C. e Da Silva, R. S. M. 2004b. Hepatopancreas gluconeogenesis during fasting in crabs previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137: 383-390.

Oliveira, G.T. and 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.* 127 B, 375-381.

Oliveira, G.T. e Da Silva, R.S.M. 1997. Gluconeogenesis of hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, 118 A (4): 1429-1435.

Oliveira, G.T.; Fernandes, F.A.; Bueno, A.A.P.; Bond-Buckup, G. 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 147, 600-606.

Pajor, A.M., Hirayama, B.A., Wright, E.M., 1992. Molecular biology approaches to comparative study of Na<sup>(+)</sup>-D-glucose cotransport. *Am. J. Physiol.* 263, R489– R495.

Pascual, I.; Berjón, A.; Lostao, M.P.; Barber, A. 2006. Transport of D-galactose by the gastrointestinal tract of the locust, *Locusta migratoria*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 143, 20 – 26

Pellegrino, R., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M. 2008. Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 358, 144–150.

Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15, 1–60.

Radford, C.A.; Marsden, I.D.; Davison, W.; Taylor, H.H. 2005. Haemolymph glucose concentrations of juvenile rock lobsters, *Jasus edwardsii*, feeding on different carbohydrate diets. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 140, 241-249.

Rice, M. A and Grover C. Stephens, G. 1988. Influx and Transepithelial Flux of Amino Acids in the Mussel, *Mytilus Edulis*. *Journal of Experimental Biology* 135,275-287

Santos, E.A e Nery, L.E.M. 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A(4):1033-1035.

Schein V, Chitto ALF, Etges R, Kucharski, L. C., Wormhoudt, Da Silva' R.S.M. 2005a. Effects Of Hypo- Or Hyperosmotic Stress On Gluconeogenesis, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity, And Gene Expression In Jaw Muscle Of The Crab *Chasmagnathus Granulata*: Seasonal Differences. *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology* 316 (2), 202-206.

Schein, V.; Chittó, A.L.F.; Etges, R.; Kucharski, L.C.; Van Wormhoudt, A.; DA Silva, R.S.M. 2005b. Effects of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Bioch. Physiol.B.* v.140, p.561-567.

Schleich, C.E., Goldemberg, L.A., Mananes, A.A.L., 2001. Salinity dependent Na<sup>+</sup>-K(+)ATPase activity in gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. Gen. Physiol. Biophys. 20, 255–266.

Seki, Y.; Sato, K.; Kono, T.; Akiba, Y. 2003. Broiler chickens (*Ross strain*) lack insulin responsive glucose transporter GLUT 4 and have GLUT 8 cDNA. General and Comparative Endocrinology. 133, 80-87.

Shinagawa, A., Suzuki, T., Konosu, S. 1995. Preliminary studies on the effects of salinity on intracellular nitrogenous osmolytes in various tissues and hemolymph of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (von Siebold, 1824). Crustaceana 68, 129–137.

Stewart, M.G. and Bamford, D.R. 1976. Absorption of soluble nutrients by the mid-gut of the bivalve *Mya arenaria*. J. Molluscan Stud. 42, 63– 73.

Tan, C.H. and Choong K.Y. 1981. Effect of hyperosmotic stress on haemolymph protein, muscle ninhydrin-positive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Comp Biochem Physiol A 70, 485-489.

Towle, D. and Weihrauch, D. 2001. Osmoregulation by Gills of Euryhaline Crabs: Molecular Analysis of Transporters. American Zoologist. 770-780.

Turcato, G.S. 1990. Estudo bioecológica do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade federal do Rio Grande do Sul.

Underwood, H.A.; Wassmer, G.T.; Page, T.L. 1997. In: Dantzeler, W.H. (ed.). Handbook of Comparative Physiology. Oxford University Press, New York,. P.1654-1763.

Verri, T.; Mandal, A.; Zilli L.; Bossa, D.; Mandal, P.K.; Ingrosso, L.; Zonno, V.; Vilella, S.; Ahearn, G.A.; Storelli, C. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol A* 130, 585–606.

Villela, S.; Zilli, L.; Ingrosso, L.; Schiavone, R.; Zonno, V.; Verri, T.; Storelli, C. 2003. Differential expression of Na<sup>+</sup>/D-glucose cotransport in isolated cells of *Marsupenaeus Japonicus* hepatopancreas. *J Comp Physiol B* . 173: 679–686

Vinagre, A. S. e 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.; Amaral, A.P.N.; Ribarcki, F.P.; Silveira, E.F.; Périco, E. 2007. Seasonal variations of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A.* 146, 514-519.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M. 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C* 122, 121–129.

Weber, Roy E.; Jane W. Behrens, Hans Malte and Angela Fago. 2008. Thermodynamics of oxygenation-linked proton and lactate binding govern the temperature sensitivity of O<sub>2</sub> binding in crustacean (*Carcinus maenas*) hemocyanin *Journal of Experimental Biology* 211, 1057-1062.

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H. Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H. 2004. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. *Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.* 148, 1-80.

Welcomme, L. and Devos, P. 1991. Energy consumption in the perfused gills of the estuarine crab *Eriocheir sinensis* adapted to freshwater. *J.Exp.Zool.* 257, 150-159.

Wellcomme, L. e Devos, P. 1994 Immunological identification and biochemical characterization of glucose transporter in the posterior gills of the crab *Carcinus maenas* (L). J. Exp. Zool. v.268, p. 218-223.

Whiteley, N. M.; Taylor, E. W. and A. Haj, J. El. 1997. Seasonal and latitudinal adaptation to temperature in crustaceans. Journal of Thermal Biology Vol. 22, 419-427

Zhao, Feng-Q and Keating, A.F. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. Current Genomics. 8 (2), 113-128.

**Table 1:** Physicochemical parameters of estuarine ambient and hemolymph of *N.granulata*.

	Osmolality mOsm / Kg H <sub>2</sub> O			pH -log [H]		Temperature °C		
	Water		Hemolymph	Water	Hemolymph	Water	Air	
	25%	MD 75%						
<b>Winter</b>	41	145 (6)	170	967 ± 85 (6)	8.2 ± 0.04 <sup>*b</sup> (6)	7.6 ± 0.35 (6)	17 ± 0.7 (8)	18.5 ± 0.6 (8)
<b>Spring</b>	81	96 (8)	118	876 ± 134 (8)	8.0 ± 0.02 <sup>*</sup> (8)	7.7 ± 0.02 (8)	24.6 ± 2.5 (8)	26 ± 2.0 (8)
<b>Summer</b>	97	529 (8)	582	833 ± 67 <sup>a</sup> (8)	7.8 ± 0.28 (8)	7.6 ± 0.03 (8)	29.0 ± 1.4 (8)	32 ± 2.8 (8)
<b>Autumn</b>	54	112 (6)	136	883 ± 122 (6)	8.4 ± 0.01 <sup>*b</sup> (6)	7.1 ± 0.06 <sup>c</sup> (6)	18 ± 0.5 (8)	19 ± 1.0 (8)

Results of water osmolality expressed as average, percents 25 and 75 %, respectively.

Results of hemolymph osmolality, pH and temperature expressed as mean  $\pm$  SDM.

\*  $p \leq 0.05$  in comparison with hemolymph.

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, spring and autumn.

<sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  in comparison with spring and summer.

<sup>c</sup>  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, spring and summer.

Number of samples in parenthesis

**Table 2:** Effect of sodium free medium and of floretin and florizin in the uptake 1- $^{14}\text{C}$  2-deoxy-D-glucose and 3-O- $^{14}\text{C}$  methyl-D-glucose (MG) in gills of *N.granulata*

	DG			MG			
	Control	Sodium Free	Floretin	Control	Sodium Free	Floretin	Florizin
<b>AG</b>	0.39 ± 0.16 (5)	0.45 ± 0.17 (19)	0.18 ± 0.10 <sup>a</sup> (4)	0.18 ± 0.08* (10)	0.19 ± 0.08* (18)	0.12 ± 0.07 (4)	0.16 ± 0.05 (10)
<b>PG</b>	0.39 ± 0.19 (5)	0.57 ± 0.22 <sup>b</sup> (20)	0.11 ± 0.04 <sup>c</sup> (4)	0.13 ± 0.06* (10)	0.16 ± 0.07* (18)	0.11 ± 0.03 (4)	0.12 ± 0.05 (10)

The results show as tissue/medium (T/M) ratio and expressed as mean ± SDM.

\*  $p \leq 0.05$  in comparison with DG.

<sup>a</sup>  $p \leq 0.05$  in comparison with control group and sodium free.

<sup>b</sup>  $p \leq 0.05$  in comparison with control group and floretin.

<sup>c</sup>  $p \leq 0.05$  in comparison with control group and sodium free.

Number of crabs in parenthesis.



Figure 1

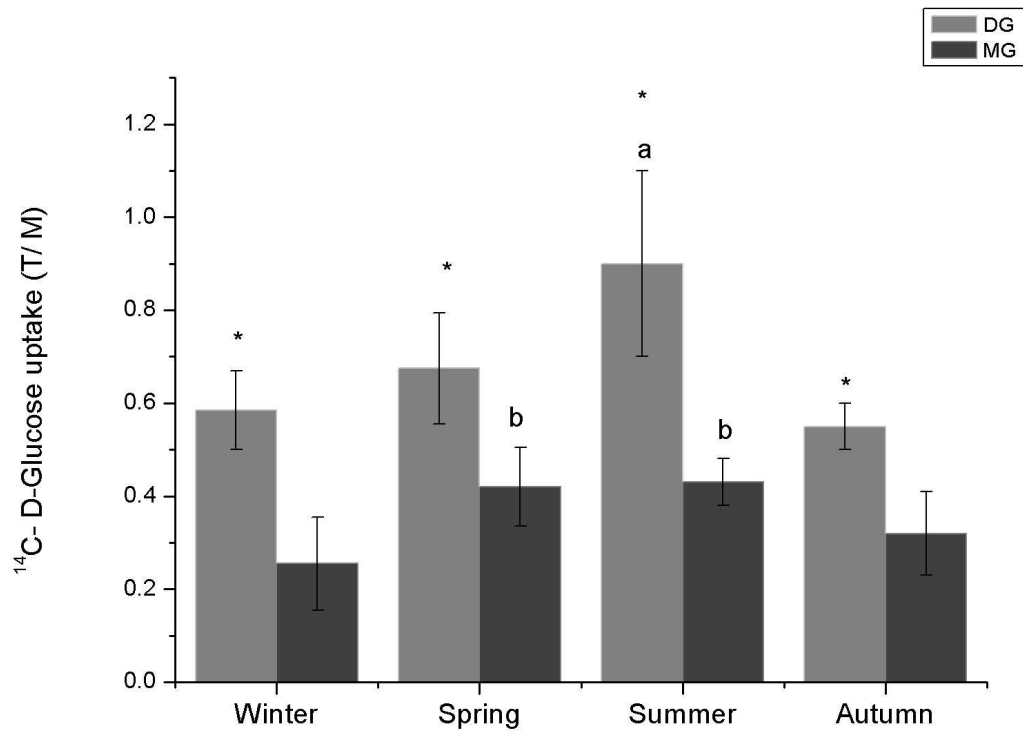


Figure 2

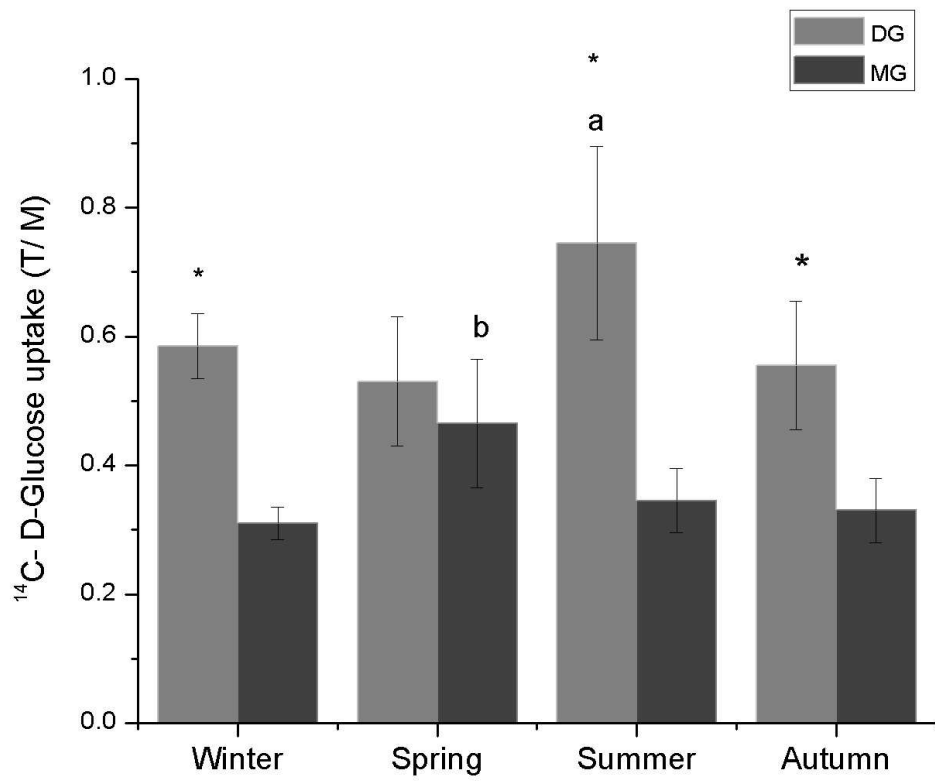


Figure 3

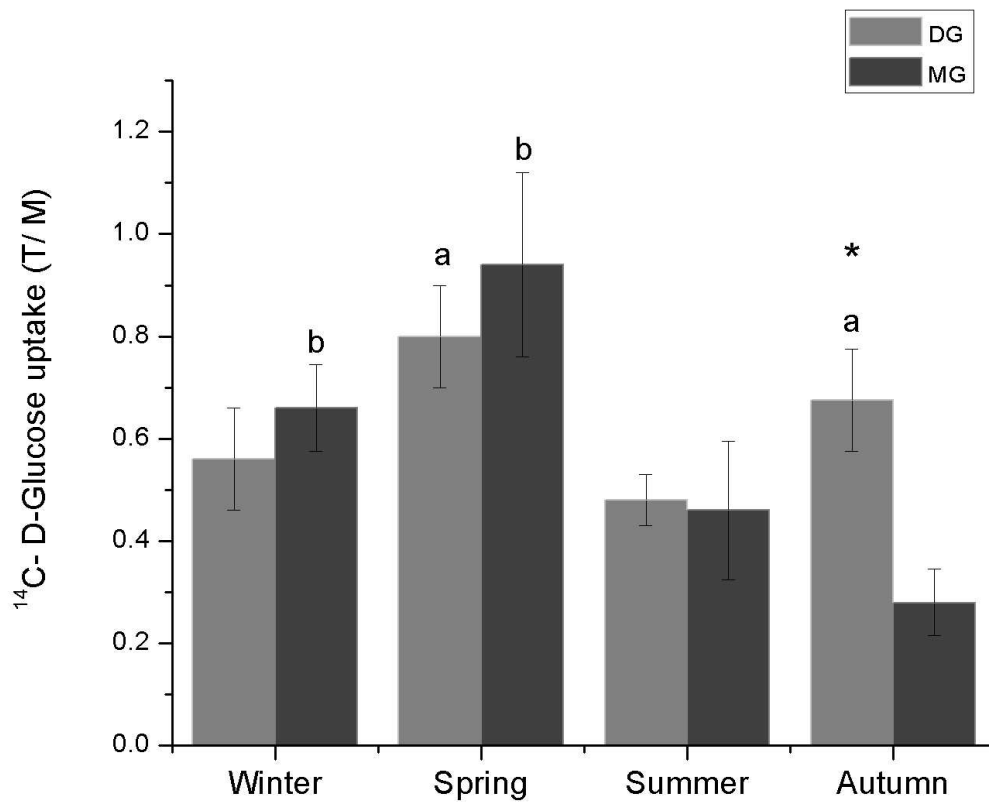


Figure 4

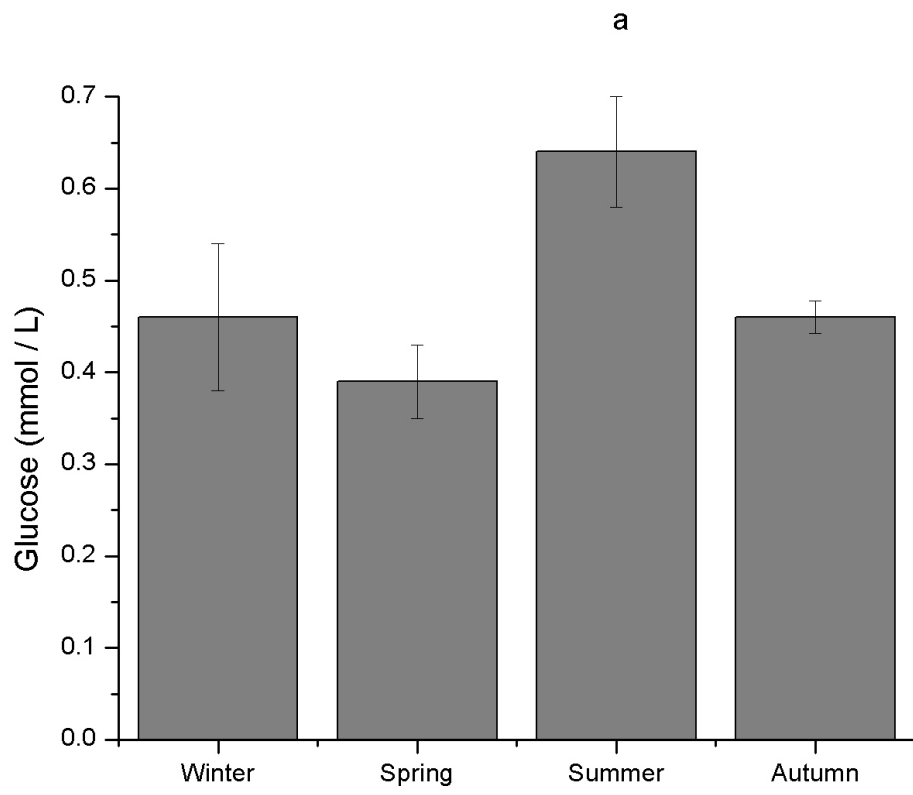
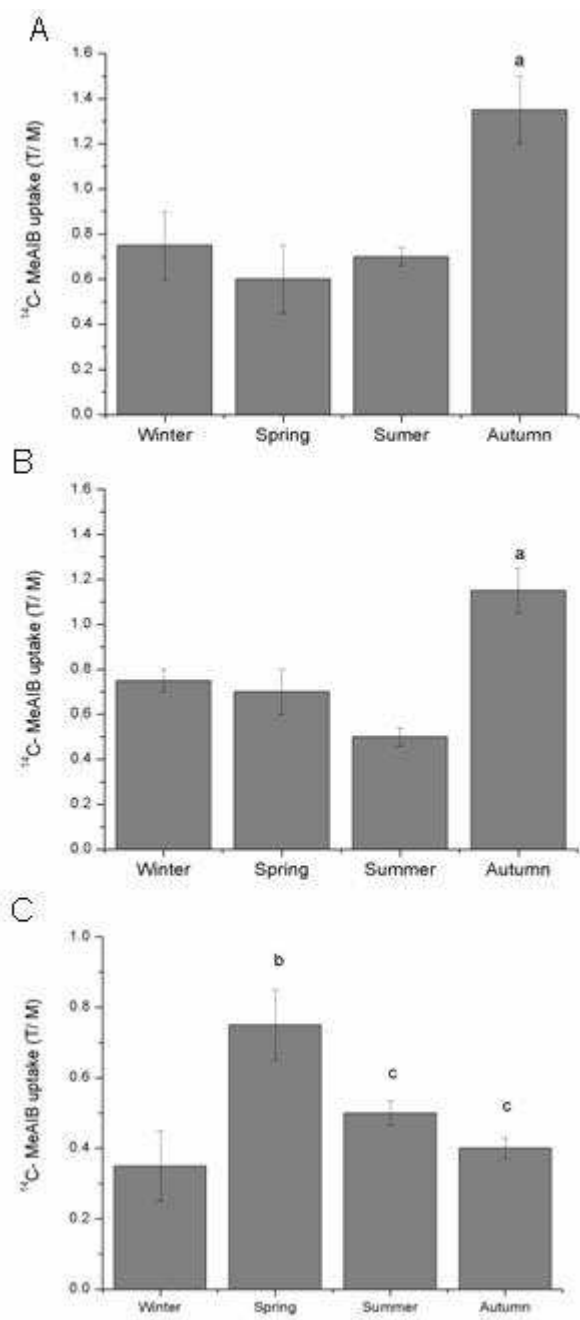


Figure 5



**Figure 1:** Effect of seasonality in the uptake of 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxy-D-glucose (DG) and 3-O-[<sup>14</sup>C] methyl-D-glucose (MG) in posterior gills of *N.granulata*. Results expressed a mean ± SDM, n= 8-10 crabs. \*  $p \leq 0.05$  in comparison with MG. **a**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, spring and autumn. **b**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter and autumn.

**Figure 2:** Effect of seasonality in the uptake of 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxy-D-glucose (DG) and 3-O-[<sup>14</sup>C] methyl-D-glucose (MG) in anterior gills of *N.granulata*. Results expressed a mean ± SDM, n= 8-10 crabs. \*  $p \leq 0.05$  in comparison with MG. **a**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, spring and autumn. **b**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, summer and autumn.

**Figure 3:** Effect of seasonality in the uptake of 1-[<sup>14</sup>C] 2-deoxy-D-glucose (DG) e 3-O-[<sup>14</sup>C] methyl-D-glucose (MG) in jaw muscle of *N.granulata*. Results expressed a mean ± SDM, n= 8-10 crabs. \*  $p \leq 0.05$  in comparison with MG. **a**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter and summer. **b**  $p \leq 0.05$  in comparison with summer and autumn.

**Figure 4:** Effect of seasonality in the hemolymph glucose concentration of *N.granulata*. Results expressed a mean ± SDM, n= 10-15 crabs. **a**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, spring and autumn.

**Figure 5:** Effect of seasonality in the uptake of [<sup>14</sup>C]-MeAIB in posterior gills (**A**), anterior gills (**B**) and jaw muscle (**C**) of *N.granulata*. Results expressed a mean ± SDM, n=6-10 crabs. **a**  $p \leq 0.05$  in comparison with winter, spring and summer. **b**  $p \leq 0.05$  in

comparison with winter, summer and autumn.  $c p \leq 0.05$  in comparison with winter and spring.