

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia

**Efeito do estresse hiperosmótico ou hiposmótico, *in vitro*,
sobre o metabolismo de carboidrato, em tecidos do
caranguejo *Neohelice granulata***

Eric Luis Kessler

Orientadora: Prof^ª. Dra. Roselis S. Martins da Silva

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

Porto Alegre, 2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha maravilhosa esposa e “filhota” Meggy, sem as quais não teria conseguido passar por todas as dificuldades que enfrentei neste período de dois anos. Também, aos meus queridos e amados tios Edgar Osmar Kessler (*in memoriam*) e Odete Chiodi Kessler, dos quais recebi sempre todo auxílio e carinho necessário para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me proporcionado a chance de viver neste mundo, de aprender e progredir sem cessar, pois acredito que esta é a lei Maior.

À Prof^ª. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva, meu especial agradecimento por ter me proporcionado a graça de participar deste grupo fantástico de seres humanos que fazem parte do LaMEC. Muito obrigado por ter acolhido com tanto carinho e confiança um profissional com poucos conhecimentos desta área tão bonita da Biologia.

Ao professor Luiz Carlos Rios Kucharski, pelo bom humor e pela disposição de ajudar sempre que procurado para tal.

A TODOS os colegas do LaMEC, que me ajudaram muito desde o início e, sem os quais, teria sido praticamente impossível desenvolver a presente dissertação. Destaco os colegas Ricardo Pellegrino, Sandra Costa Valle, Tiago Leal Martins e Camila Rosseti.

Aos meus pais, que pela graça e, em comunhão com Deus, me concederam o dom da vida.

À minha esposa, pessoa importantíssima na minha vida, que muito apoiou e suportou minha ausência em diversos momentos.

À minha “filhota” do coração, Meggy, que me alegrava sempre, principalmente, naquelas madrugadas mais difíceis e estressantes de confecção desta dissertação.

Aos professores do curso de Licenciatura em Educação Física da Unisinos: Lino Pinto de Oliveira Júnior, Vera Lúcia Pereira Brauner e Anneliese Schonhorst Rocha, por sua capacidade técnica, didática e, principalmente, por seu envolvimento com a questão do aprendizado crítico-reflexivo e o desenvolvimento ético e moral como subsídio para a atuação profissional. Também, por sua dedicação, profissionalismo, conhecimento e muitas outras qualidades que não caberiam em apenas uma página.

Ao curso de Pós-graduação em Fisiologia e a todos os professores do programa, por terem contribuído com uma parcela de conhecimento desta área tão vasta de estudo.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Mestrado, sem a qual não poderia ter sido parte do corpo discente do PPGFisio.

Aos caranguejos *N. granulata*, sem os quais nada disto teria sido possível.

E, finalmente, por último e mais importante, agradeço aos meus tios Edgar Osmar Kessler (*in memoriam*) e Odete Chiodi Kessler, que tornaram possível meu sonho de cursar uma universidade e de conhecer outro país. Sem o seu auxílio fraternal, não sei o que estaria fazendo atualmente no âmbito profissional.

Muito obrigado a todos.

SUMÁRIO

RESUMO	05
INTRODUÇÃO	06
OBJETIVOS	15
MATERIAL E MÉTODOS	16
1. Coleta e manutenção dos animais	16
2. Determinação da osmolalidade dos meios de incubação	16
3. Procedimentos experimentais	17
3.1. Estudo <i>in vitro</i>	17
3.2. Captação de 2-Deoxi-D-1- ¹⁴ C-Glicose	18
3.3. Produção de ¹⁴ CO ₂ a partir da oxidação de ¹⁴ C-Glicose	18
3.4. Síntese de glicogênio a partir de ¹⁴ C-Glicose	19
3.5. Dosagem de proteínas	20
4. Análise estatística	20
RESULTADOS	21
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	30
REFERÊNCIAS	37

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito do estresse hiperosmótico ou hiposmótico agudo, *in vitro*, sobre o metabolismo da glicose em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo da mandíbula do caranguejo *Neohelice granulata*. Foi avaliada a captação de 2-Deoxi-D-1-¹⁴C-Glicose, a formação de ¹⁴CO₂ a partir da oxidação de ¹⁴C-glicose e a síntese de glicogênio a partir de ¹⁴C-glicose em todos os tecidos estudados. Não foram constatadas diferenças significativas na captação de 2-Deoxi-D-1-¹⁴C-glicose em nenhum dos tecidos estudados. Nas brânquias anteriores, brânquias posteriores e no hepatopâncreas, o estresse hiperosmótico reduziu significativamente, em relação ao grupo controle, a formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-glicose. Entretanto, o estresse hiposmótico reduziu a formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-glicose somente no hepatopâncreas. Nos outros tecidos, o estresse hiposmótico não alterou a formação de ¹⁴CO₂ a partir da oxidação de ¹⁴C-glicose. No estresse hiposmótico, a capacidade de síntese de glicogênio a partir de ¹⁴C-glicose aumentou, significativamente, no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores. Contudo, nas brânquias posteriores, este estresse não alterou, de forma significativa, a formação de ¹⁴C-glicogênio. Os resultados mostram que o estresse hiperosmótico aumentou a capacidade de síntese de ¹⁴C-glicogênio somente no hepatopâncreas. Já, nos outros tecidos, não foram verificadas alterações significativas. No músculo mandibular, o estresse osmótico agudo (hiposmótico e hiperosmótico), *in vitro*, não alterou, significativamente, nenhum dos parâmetros metabólicos determinados neste estudo. Nossos resultados sugerem que os mecanismos responsáveis pela redução regulatória do volume celular (RVD) ou pelo aumento regulatório do volume celular (RVI), após o estresse osmótico agudo, *in vitro*, não alteram a captação de glicose pelos tecidos de *N. granulata*. Estes resultados apontam para um controle endócrino ou de outros fatores endógenos sobre a captação de glicose, via GLUTs, nos tecidos de *N. granulata*, visto que, a alteração de volume tissular, decorrente do estresse agudo, *in vitro*, não foi capaz de modificar significativamente a captação de 2-DG. Nas brânquias anteriores, não foi verificada alteração na capacidade de oxidação de glicose no choque hiposmótico, contudo, a síntese de ¹⁴C-glicogênio aumentou significativamente neste tecido. Este resultado sugere que durante o estresse hiposmótico agudo, a glicose livre intracelular seria utilizada na síntese de glicogênio em resposta à modificação de volume celular. Em brânquias posteriores, não foi constatada alteração significativa da formação de ¹⁴CO₂ e de síntese de ¹⁴C-glicogênio a partir de ¹⁴C-glicose em resposta ao estresse hiposmótico agudo, *in vitro*. Como, nas brânquias, a atividade de oxidação de glicose é bastante elevada, quando comparada àquela verificada nos outros tecidos, a atividade basal de oxidação seria suficiente para suprir a energia necessária ao processo osmorregulatório, durante o estresse osmótico agudo, *in vitro*. O estresse hiperosmótico agudo, *in vitro*, diminuiu, de forma marcante, a formação de ¹⁴CO₂ a partir de glicose no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores, contudo, não alterou a oxidação no músculo. No hepatopâncreas de *N. granulata*, os resultados do presente trabalho sugerem que a resposta ao estresse hiperosmótico, *in vitro*, seria semelhante àquela verificada durante o choque hiposmótico: a diminuição da oxidação de glicose levaria a um redirecionamento deste substrato para a via de síntese de glicogênio. A submissão do tecido muscular ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico agudo, *in vitro*, não alterou de forma significativa as vias do metabolismo da glicose investigadas no presente trabalho. Assim, as alterações de volume celular não seriam suficientes para ativar ou inibir as diferentes vias envolvidas na utilização da glicose neste tecido. Concluindo, a alteração do volume celular decorrente do estresse osmótico agudo, *in vitro*, alterou o fluxo de carbonos nos tecidos hepatopancreático e branquial de *N. granulata*, sugerindo a participação do metabolismo de carboidrato no processo regulatório de volume celular em tecidos de caranguejos.

INTRODUÇÃO

A vida dos organismos em diferentes *habitats*, geralmente, envolve ajustes fisiológicos, bioquímicos e comportamentais que, por meio de uma interação dinâmica, entre o meio ambiente e o animal, estabelecem a manutenção do equilíbrio interno.

O ambiente aquático não é constante nem uniforme no que tange à salinidade. Enquanto a salinidade das águas oceânicas abertas apresenta uma concentração de aproximadamente 35‰, a salinidade em outros ambientes aquáticos pode variar entre 70‰ em lagoas e lagos hipersalinos e próxima de 0‰ em rios. Além disso, águas costeiras e de estuários apresentam variações de salinidade devido à oscilação do ciclo das marés, à variação pluviométrica sazonal, aos ventos ou a outros eventos da natureza. Apesar destas variações, as águas costeiras e os estuários são abundantes em nutrientes e constituem um rico ambiente para o desenvolvimento de organismos que tenham desenvolvido estratégias biológicas para enfrentar as oscilações diárias e sazonais de salinidade.

Entre os crustáceos decápodes encontram-se desde animais marinhos estenoalinos, com pouca ou nenhuma capacidade osmorreguladora, portanto, tolerantes a pequenas variações de salinidade, até animais eurialinos, capazes de tolerar grandes variações de salinidade do meio e com mínimas alterações da concentração osmótica hemolinfática (Gilles e Delpire, 1997; Gilles, 1997).

Em áreas estuarinas e intertidais as variações constantes de salinidade impõem um estresse iônico à sua biota. As oscilações de salinidade levam os organismos estuarinos, como o *N. granulata*, a mudarem a composição orgânica e inorgânica dos fluidos corporais, exigindo destes animais ajustes homeostáticos compensatórios (Wehner *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2007; Bianchini *et al.*, 2008).

Várias adaptações permitiram aos crustáceos eurialinos ocuparem habitats estuarinos e dulciaquícolas: 1) redução da concentração dos líquidos corporais até valores compatíveis com a função celular; 2) redução da ingestão de água; 3) redução da permeabilidade do tegumento; 4) aumento da excreção de água através da glândula antenal; 5) presença de sistemas de transporte ativo de solutos. Por meio dessas estratégias, os gastos energéticos para a manutenção de gradientes osmóticos iônicos elevados, são reduzidos (Gilles e Delpire, 1997).

De acordo com Gilles e Delpire (1997), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar o estresse osmótico: (a) regulação anisosmótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolalidade da hemolinfa independente da

osmolalidade do meio externo; (b) regulação isosmótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolalidade do fluido e do volume intracelular, com o objetivo de mantê-lo isosmótico em relação ao extracelular.

O processo de regulação anisosmótica do fluido extracelular resulta de um balanço entre os fenômenos de efluxo e influxo de efetores osmóticos, principalmente, íons e água (Gilles e Delpire, 1997). Os principais componentes fisiológicos desse balanço, entre os efetores osmóticos e a água, são a permeabilidade da superfície corporal e o transporte ativo, principalmente, nas brânquias, no trato intestinal e nos órgãos excretores. Já, o termo regulação isosmótica do fluido intracelular, define os mecanismos responsáveis pelo ajuste ativo da pressão osmótica intracelular em relação a novas pressões osmóticas dos fluidos corpóreos, impedindo assim grandes alterações na concentração intracelular (Gilles e Delpire, 1997).

A regulação isosmótica do fluido intracelular implica em duas fases de controle do volume celular. A primeira fase está relacionada às respostas imediatas de alterações do volume celular, como consequência de choques osmóticos e envolve a capacidade de plasticidade da membrana plasmática. A segunda fase está relacionada aos eventos de influxo e efluxo de efetores osmóticos, tanto orgânicos como inorgânicos, entre os quais: Na^+ , Cl^- e K^+ (Gilles, 1987; Gilles e Delpire, 1997).

O caranguejo *Neohelice granulata* faz parte da família Brachyura (Decapoda, Crustacea), que evoluiu de formas marinhas, tornando-se uma espécie tipicamente estuarina. Ele habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, desde o litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o Golfo de São Mathias, na Argentina (Botto e Irigoyen, 1980). Na região do estuário de Tramandaí (RS), constituído pelas lagoas Armazém e Tramandaí, são encontradas grandes populações de *N. granulata*. Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre o ambiente marinho e o límnico, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros de completa exposição do substrato (Odum, 1985). Turcato (1990), em seu estudo sobre a bioecologia do *N. granulata*, verificou uma variação do teor de oxigênio dissolvido na água de 2,78 mgO_2/L até 11,78 mgO_2/L e da salinidade de 0,22‰ até 34‰.

Em seu habitat, este crustáceo distribui-se entre os pisos supra e mesolitorâneos, em áreas inundáveis, com ou sem vegetação halo-hidrófila. Nesses locais, os animais abrem galerias ou tocas, com profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático, fazendo com que sempre haja água no fundo da toca. Essas habitações têm

importância na ecofisiologia desses crustáceos, protegendo-os das amplas variações de salinidade e de temperatura do ambiente (Botto e Irigoyen, 1980). Atkinson e Taylor (1968) sugerem também que, além da proteção contra variações extremas de umidade, de salinidade e de temperatura, a utilização das tocas seria uma estratégia de proteção contra possíveis predadores.

Segundo Turcato (1990), nos meses de primavera e verão, o *N. granulata* situa-se na zona infralitoral em busca de alimento. Já, nos meses de outono e inverno, o animal permanece no interior das tocas por um período maior e apresenta uma redução da atividade metabólica.

Esse caranguejo, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos *et al.*, 1987), é capaz de suportar longos períodos fora da água e de exposição ao sol, sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon *et al.*, 1974). Quando exposto ao ar atmosférico, diminui o consumo de oxigênio e reduz a mobilidade (Santos *et al.*, 1987). Algumas espécies de caranguejos, como o *N. granulata*, possuem habilidade em manter as brânquias constantemente umedecidas ao saírem do ambiente aquático. Esta estratégia é possível por meio de um sistema de circulação localizado entre as bases dos pereiópodos que captam a água da superfície externa do corpo e a liberam na cavidade branquial, promovendo a renovação dos teores de oxigênio (Hartnoll, 1988; Bond-Buckup *et al.*, 1991; Luquet *et al.*, 2000).

O caranguejo *N. granulata* pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, pois suporta variações de salinidade de 0‰ até 40‰, hiper-regulando de 0‰ até 20‰ e hipo-regulando em 40‰ (Bianchini *et al.*, 2008). O ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e verão, respectivamente (Bromberg, 1992).

Em relação ao comportamento alimentar, o *N. granulata* é uma espécie onívora-detritivora e alimenta-se, na natureza, predominantemente de vegetais e de detritos (Bond-Buckup *et al.*, 1991). O hábito alimentar oportunista foi caracterizado por meio de análise do conteúdo estomacal que revelou a presença de sedimentos e de restos de origem vegetal e animal que apresentavam diferenças quantitativas e qualitativas conforme a estação do ano (D’Incao *et al.*, 1990). Este caranguejo, oportunamente, alimenta-se de outros animais e, eventualmente, comporta-se como canibalista, atacando suas próprias comunidades (Botto e Irigoyen, 1980).

Em função da excelente adaptação às condições de laboratório, o caranguejo *N. granulata* é considerado um modelo biológico adequado para o estudo do metabolismo intermediário em invertebrados (Kucharski, 1990). Como se trata de uma espécie que vive em

estuário, tolerando alterações freqüentes de salinidade, é um modelo biológico ideal para a investigação dos mecanismos envolvidos na aclimação ao estresse hiperosmótico ou hiposmótico. Somado a isso, diversas pesquisas realizadas com este crustáceo, junto ao Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada (LaMEC), têm elucidado o envolvimento de diferentes vias do metabolismo de carboidratos e de aminoácidos no processo de osmorregulação (Da Silva e Kucharski, 1992; Oliveira e Da Silva, 2000; Schein *et al.* 2004; 2005; Chittó *et al.*, 2009).

A participação do metabolismo de aminoácidos no processo de osmorregulação em diversas espécies de invertebrados e de vertebrados é investigada há mais de um século.

Leon Fredericq, fundador do Instituto de Fisiologia da Universidade de Liège, investigou, em 1885, a concentração de íons e de substâncias orgânicas nos tecidos de invertebrados e de vertebrados marinhos, como elasmobrânquios, e constatou que havia diferença quando comparada àquela do meio ambiente em que viviam os animais (Gilles, 1997).

Na década de 1930, Marcel Florin, um dos fundadores da bioquímica comparada, aclimatou espécies de invertebrados à água marinha ou à água diluída, com o objetivo de estudar as substâncias orgânicas citadas por Fredericq em 1885. Florin observou que no caranguejo *Eriocheir sinensis* a concentração total de aminoácidos livres no músculo aumentou duas vezes quando os animais foram transferidos da água diluída para a água do mar. O mesmo resultado foi constatado por Shaw, três anos depois, quando transferiu o caranguejo eurialino *Carcinus maenas* de um meio diluído para a água do mar (Gilles, 1997).

Os aminoácidos exercem muitas funções nos processos biológicos como: 1) precursores na biossíntese de proteínas, glicose e lipídios; 2) desempenham papel de doadores/transportadores de átomos de carbono e de nitrogênio; 3) fornecem energia; 4) têm funções como neurotransmissores ou neuromoduladores; 4) participam de sistemas de tamponamento dos organismos; 5) agem como osmólitos (Pierce, 1982).

Está bem documentado na literatura especializada que crustáceos mantêm uma concentração de aminoácidos livres intracelulares que, aliada a compostos nitrogenados como óxidotrimetilamino e betaína, perfazem 50 a 60% dos efetores osmóticos nessa superclasse (Gilles, 1997). Em crustáceos, a concentração de aminoácidos é cerca de 10 vezes maior que aquela nos tecidos de mamíferos, sendo a arginina, a alanina, a glicina, a prolina, o ácido glutâmico e a taurina os mais importantes. 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).

Schein (1999) mostrou que em *N. granulata* submetido ao estresse hiperosmótico, as concentrações de glicina, alanina, serina, arginina e prolina diminuíram na hemolinfa, sugerindo que neste caranguejo estes aminoácidos estariam sendo captados pelos tecidos e envolvidos no processo de aclimatação ao meio hiperosmótico.

Em axônios isolados de crustáceos, submetidos ao estresse hiposmótico, foi demonstrado um aumento do efluxo e uma diminuição do influxo de aminoácidos (Gilles, 1997).

Bock (2005) investigou o efeito do estresse osmótico sobre o metabolismo de aminoácidos nos tecidos de *N. granulata*, submetidos a estresse agudo, *in vitro*. Os resultados mostram que o controle da síntese de proteínas parece estar envolvido no ajuste metabólico da concentração intracelular de aminoácidos no hepatopâncreas, no músculo mandibular e nas brânquias submetidos à alteração osmótica aguda, *in vitro*. Por outro lado, durante o estresse hiposmótico agudo, *in vitro*, a diminuição na captação de aminoácidos via sistema A e o aumento na oxidação total de ^{14}C -L-leucina, foram estratégias usadas como mecanismos para reduzir as concentrações intracelulares de aminoácidos nas brânquias posteriores e anteriores, respectivamente (Bock, 2005). A autora também verificou que a captação de aminoácidos e a mobilização de ^{14}C -proteína não foram mecanismos utilizados para aumentar a concentração intracelular de aminoácidos em todos os tecidos estudados (Bock, 2005).

Recentemente, Augusto *et al.* (2007) investigaram a contribuição dos aminoácidos livres na regulação isosmótica intracelular em duas espécies de camarões, *Macrobrachium amazonicum* e *M. olfersii*, expostos à água doce ou ao meio salino. A concentração de aminoácidos livres em *M. olfersii* adulto aumenta no músculo, nas brânquias e no sistema nervoso central após exposição ao meio salino. Em *M. amazonicum* a transferência do indivíduo adulto para a salinidade de 25‰ aumentou a concentração dos aminoácidos livres intracelulares no músculo e nas brânquias.

A glicose é a principal hexose presente na hemolinfa de crustáceos. Diversos fatores influenciam a concentração hemolinfática de glicose em crustáceos, podendo-se salientar: o estágio da muda, as variações sazonais e circadianas, a dieta administrada, o estado alimentar, o teor de oxigênio no meio e a regulação hormonal via hormônio hiperglicemiante (CHH) (Kucharski e Da Silva, 1991; Da Silva e Kucharski, 1992; Santos e Keller, 1993; Henry *et al.*, 1994; Hervant *et al.*, 1999; Rosas *et al.*, 2001; Hervant e Renault, 2002; Chang, 2005; Fanjul-Moles, 2006; Pascual *et al.*, 2006).

Em *N. granulata*, pesquisas sobre o metabolismo de carboidratos têm demonstrado a presença das seguintes vias: glicogênese, glicogenólise, gliconeogênese, neoglicogeniogênese

e glicólise em diferentes tecidos. Além disso, evidências experimentais mostram que estas vias alteram-se em função da composição da dieta administrada aos caranguejos (Oliveira e Da Silva, 1997; Marqueze *et al.*, 2006; Pellegrino *et al.*, 2008).

A participação do metabolismo de carboidratos, durante os processos de aclimação aos estresses hiper e hiposmótico, foi evidenciada no caranguejo *N. granulata* (Da Silva e Kucharski, 1992; Oliveira e Da Silva, 2000; Schein *et al.*, 2004, 2005; Chittó *et al.*, 2009). A diminuição na concentração de glicose livre nas brânquias anteriores e posteriores, durante o estresse hipo e hiperosmótico, *in vivo*, indica a utilização desta glicose como fonte de energia durante a aclimação ao estresse osmótico (Chittó, 2000; Vinagre e Da Silva, 2002).

Durante o estresse hiposmótico, em caranguejos alimentados com as dietas rica em carboidratos (HC) ou rica em proteínas (HP), a concentração de glicose circulante aumentou. Os animais que receberam uma dieta HC apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de glicogênio hepatopancreático e muscular. Entretanto, no grupo que recebeu a dieta HP, o glicogênio do hepatopâncreas aumentou e do muscular permaneceu inalterado após 72 horas de estresse hiposmótico, reforçando o possível envolvimento da via gliconeogênica durante a adaptação ao estresse osmótico (Da Silva e Kucharski, 1992).

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática na aclimação ao estresse hiposmótico em *N. granulata*. Animais alimentados com a dieta HP e submetidos ao estresse hiposmótico apresentaram aumento na capacidade gliconeogênica a partir de ¹⁴C-alanina às 72 horas de estresse osmótico. Nos animais alimentados com a dieta HC o aumento na atividade gliconeogênica ocorreu somente às 144 horas de estresse hiposmótico. Porém, quando o substrato utilizado era o ¹⁴C-lactato, tanto no grupo HP como no HC, ocorreu uma redução na atividade gliconeogênica a partir das 72 horas de estresse osmótico (Oliveira e Da Silva, 2000). Os dados sugerem o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática no ajuste metabólico de aminoácidos durante a aclimação ao estresse hiposmótico.

Schein *et al.* (2005) verificaram que a atividade gliconeogênica no músculo mandibular do *N. granulata*, no verão, diminuiu após 24 horas de estresse hiperosmótico e inverteu a atividade da PEPCK no espaço intracelular, isto é, diminuiu a atividade na fração mitocondrial e aumentou na fração citosólica. No entanto, após 72 horas de choque hiperosmótico, os autores encontraram um aumento na atividade gliconeogênica, possivelmente, devido a um aumento na expressão gênica da PEPCK ocorrido às 24 horas de estresse osmótico. No inverno, durante o choque hiposmótico, a capacidade gliconeogênica e a atividade da PEPCK foram reduzidas e a expressão gênica da enzima achava-se

extremamente reduzida. Esses dados demonstram que a via gliconeogênica muscular está envolvida nos ajustes metabólicos de aclimatação aos choques hiposmótico e hiperosmótico e que pode ser modulada conforme a estação do ano (Schein *et al.*, 2005).

A ocorrência da gliconeogênese e da neoglicogeniogênese em crustáceos, principalmente em decápodes, já foi demonstrada utilizando ^{14}C -lactato, ^{14}C -aminoácido e ^{14}C -glicerol (Hill *et al.*, 1991; Lallier e Wash, 1992; Henry *et al.*, 1994; Oliveira e Da Silva, 1997; Hervant *et al.*, 1999; Vinagre e Da Silva, 2002; Chittó, 2005; Pellegrino *et al.*, 2006). O hepatopâncreas parece ser o principal órgão no qual ocorre a gliconeogênese (Van Aardt, 1988; Hill *et al.*, 1991; Lallier e Wash, 1992; Oliveira e Da Silva, 1997; Hervant *et al.*, 1999), embora alguns estudos apontem a presença dessa via em brânquias (Thabrew *et al.*, 1971; Chittó *et al.*, 2009), hemócitos (Johnston e Davies, 1973) e músculo mandibular (Schein *et al.*, 2004, 2005; Pellegrino *et al.*, 2006). Schein *et al.* (2004) demonstraram a capacidade de conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose e a atividade da PEPCK no músculo mandibular de *N. granulata*. Os autores também verificaram a expressão do gene da PEPCK em hepatopâncreas, coração, brânquias e sistema nervoso desse caranguejo e caracterizaram a seqüência do DNAC da PEPCK (AY074922) no músculo mandibular. Em diferentes espécies de crustáceos foram detectadas, em diversos tecidos, atividades muito baixas das enzimas FBFase, G6Fase e PEPCK (Thabrew *et al.*, 1971; Walsh e Henry, 1990; Lallier e Walsh, 1991; Henry *et al.*, 1994; Hervant, 1996). Recentemente, a atividade da enzima G6Fase foi demonstrada no músculo mandibular de *N. granulata*, confirmando que a via gliconeogênica nesse tecido seria completa pela possibilidade de liberar glicose para a hemolinfa (Chittó, 2005).

Em caranguejos *N. granulata* a via gliconeogênica muscular, hepatopancreática e branquial estaria envolvida em vários outros processos de ajuste metabólico ao jejum, à realimentação, a anoxia e à recuperação da anoxia e à aclimatação ao estresse osmótico, *in vivo* (Oliveira e Da Silva, 2000; Oliveira *et al.*, 2004; Schein *et al.*, 2004; Pellegrino *et al.*, 2006; Maciel *et al.*, 2008; Chittó *et al.*, 2009).

Segundo Allen *et al.* (2000), os principais lipídios em crustáceos são os lipídios neutros, dos quais, 90% são triglicerídeos. Os lipídios de crustáceos são transportados na hemolinfa por lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Garcia *et al.*, 2002). Como não há um tecido adiposo diferenciado em crustáceos, o músculo, o hepatopâncreas e as gônadas acabam sendo os locais de armazenamento de lipídios (Kucharski e Da Silva, 1991). Durante períodos de grande demanda energética ocorre uma marcante mobilização de lipídios, principalmente, aqueles presentes no hepatopâncreas.

Os ajustes metabólicos, utilizados por diversas espécies de caranguejos, durante a aclimação ao estresse osmótico, também envolve a participação de lipídios teciduais.

Luvizotto-Santos *et al.* (2003) verificaram que em *N. granulata* aclimatado por 7 dias ao meio hiposmótico ocorreu uma diminuição significativa na concentração de lipídios totais no músculo e nas brânquias. Nestes mesmos tecidos o estresse hiperosmótico não alterou a concentração de lipídios totais. Entretanto, os lipídios do hepatopâncreas não foram mobilizados durante a regulação osmótica frente aos choques hiposmótico e hiperosmótico.

Em *N. granulata*, submetido ao estresse osmótico durante os meses de verão, ocorreu diminuição na concentração de lipídios totais nas brânquias posteriores, no hepatopâncreas e no músculo, sugerindo a utilização desse substrato energético no esforço de aclimação ao estresse osmótico (Chittó *et al.*, 2009).

Freire *et al.* (1995) investigaram a participação de fatores neuroendócrinos, presentes no sistema nervoso central, sobre a regulação da concentração de aminoácidos livres hemolinfáticos no camarão da água doce *Macrobrachium olfersi*. A concentração total de aminoácidos livres diminuiu após a exposição dos camarões ao meio hiperosmótico. Contudo, a concentração destes aminoácidos aumentou após a injeção de homogenado, preparado do sistema nervoso de camarões expostos por 6 horas ao meio hiperosmótico, em camarões mantidos em água doce. Os resultados sugerem que em *M. olfersi* a regulação anisomótica extracelular é regulada por fatores endócrinos presentes nas células neurosecretoras do sistema nervoso.

Eckhardt *et al.* (1995) verificaram o envolvimento da glândula do seio no controle neuroendócrino da osmorregulação em *Pachygrapsus marmoratus* e concluíram que esta glândula contém um peptídeo que influencia, diretamente, a função branquial. Estes autores, utilizando este caranguejo eurialino, aclimatado à água diluída, perfundiram as brânquias posteriores isoladas com o hormônio hiperglicêmico de crustáceos, obtido da glândula do seio. O CHH aumentou a diferença do potencial transepitelial e o influxo de Na⁺ em 50% nestes tecidos. Por esse motivo, os autores sugerem que este neuropeptídeo seria um importante fator envolvido no controle da osmorregulação em crustáceos decápodes.

Vinagre (1999) verificou que a ablação bilateral dos pedúnculos oculares não alterou a resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico em *N. granulata*. A autora sugeriu a possibilidade de envolvimento de outros hormônios, de bioaminas, ou de diferentes isoformas de CHH produzidas fora da glândula do seio do pedúnculo ocular que agiriam aumentando os níveis circulantes de glicose durante o estresse hiposmótico.

O caranguejo *N. granulata*, por se tratar de uma espécie que vive em ambiente estuarino, tolerando alterações frequentes de salinidade, é um excelente modelo para a investigação dos mecanismos envolvidos na aclimação ao estresse hiper ou hiposmótico.

A investigação sobre as estratégias envolvidas na regulação osmótica em cada tecido possibilitará melhor entendimento sobre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos utilizados pelos organismos para povoarem ambientes onde a osmolalidade do meio sofre constantes variações, como no caso dos estuários.

A partir do exposto, a submissão aguda dos tecidos aos estresses hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*, possibilitará avaliar a contribuição do metabolismo da glicose nas respostas às alterações osmóticas do meio extracelular, independente da ação de fatores endócrinos, nervosos ou neuroendócrinos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar o efeito do estresse hiperosmótico ou hiposmótico agudo, *in vitro*, sobre o metabolismo da glicose em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo da mandíbula do caranguejo *Neohelice granulata*.

Objetivos específicos

Determinar no hepatopâncreas, no músculo mandibular e nas brânquias anteriores e posteriores, após a o choque osmótico agudo, *in vitro*, os seguintes parâmetros metabólicos:

A captação de 2-Deoxi-D-1-¹⁴C-Glicose,

A formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-Glicose e,

A capacidade de síntese de glicogênio a partir de ¹⁴C-Glicose.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e manutenção dos animais

A coleta de *N. granulata* ocorre na margem leste da lagoa de Tramandaí-RS. São utilizados somente caranguejos machos adultos, no estágio C do período intermuda, pesando cerca de 14 ± 3 g. A captura, no sedimento areno-lodoso, dentro da água ou nas tocas, é feita manualmente. Após a coleta, os animais são transportados para o laboratório, em caixas plásticas, contendo água da lagoa.

Manutenção dos animais no laboratório

Logo após a coleta, a fim de eliminar os parasitas e limpar o conteúdo estomacal, os animais são mantidos no laboratório, em tanques aerados contendo água destilada, por um período de 24 horas. Após esta aclimatação, os caranguejos são transferidos para o ambiente controle por 10 dias, ou seja, em aquário com salinidade de 20‰, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo natural e oxigenação constante. A alimentação consiste de carne bovina crua, administrada diariamente, *ad libitum*, ao final da tarde, período de maior atividade dos animais.

2. Determinação da osmolalidade dos meios de incubação

Os meios de incubação utilizados são os descritos por Bock (2005) que, inicialmente, submeteu 3 grupos de caranguejos, durante 6 dias, às seguintes osmolalidades: 0mOsm/kg de H₂O estresse hiposmótico; 900mOsm/kg de H₂O estresse hiperosmótico; 470mOsm/kg de H₂O meio controle. No final do período experimental, amostras de hemolinfa foram coletadas das articulações das quelas dos 4^a e 5^a pereiópodos, utilizando seringas com anticoagulante oxalato de potássio 10%. Essas amostras foram usadas para a determinação da osmolalidade. A osmolalidade do anticoagulante foi subtraída dos valores das amostras. A osmolalidade de cada amostra de hemolinfa foi determinada imediatamente em osmômetro de pressão de vapor Wescor 5520. Os valores de osmolalidade hemolinfática obtidos foram: $636 \pm 21,5$ mOsm/kg de H₂O no meio hiposmótico, $853 \pm 12,45$ mOsm/kg de H₂O no meio hiperosmótico e $719 \pm 10,41$ mOsm/kg de H₂O no meio controle de 20‰.

A partir destes dados, os valores estabelecidos para submeter os tecidos ao estresse osmótico, *in vitro*, foram: 770mOsm/kg de H₂O para o grupo controle, 690mOsm/kg de H₂O para o grupo hiposmótico e 900mOsm/kg de H₂O para o grupo hiperosmótico.

Levando-se em conta os resultados da osmolalidade hemolinfática acima descritos, no presente trabalho, foram utilizados os seguintes meios de incubação:

a) Controle (770mOsm/kg de H₂O): 374mM NaCl; 10mM KCl; 25mM CaCl₂; 10mM MgCl₂; 8,8mM H₃BO₃; 10mM HEPES; 0,1mM fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF); pH 7,8.

b) Estresse hiposmótico (690mOsm/kg de H₂O): 300mM NaCl; 10mM KCl; 25mM CaCl₂; 10mM MgCl₂; 8,8mM H₃BO₃; 10mM HEPES; 0,1mM fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF); pH 7,8.

c) Estresse hiperosmótico (900mOsm/kg de H₂O) 400mM NaCl; 10mM KCl; 25mM CaCl₂; 10mM MgCl₂; 8,8mM H₃BO₃; 10mM HEPES; 0,1mM fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF); pH 7,8.

3. Procedimentos experimentais

Os animais foram crioanestesiados por imersão em recipiente com gelo tipo escama, durante 10 minutos. A seguir, a carapaça era removida e as brânquias anteriores e posteriores excisadas pela base; o hepatopâncreas e o par de músculos da mandíbula também eram retirados de cada animal. Foram utilizadas os pares número 3, 4 e 5 das brânquias anteriores e das brânquias posteriores os pares 6, 7 e 8 (Genovese *et al.* 2004). Pequenos cortes foram feitos nas lamelas das brânquias para possibilitar um maior contato destes tecidos com os meios de incubação. O músculo e o hepatopâncreas foram cortados em pequenas frações.

Antes da incubação, os tubos eram pesados apenas com o meio de incubação; este valor era anotado e, posteriormente, após a adição de aproximadamente 60-100mg de tecido (brânquias anteriores e posteriores, músculo da mandíbula ou hepatopâncreas), os tubos eram novamente pesados, para a determinação do peso do tecido utilizado. Durante estes procedimentos os tubos eram mantidos em banho de gelo. Imediatamente após este procedimento, os tubos com os tecidos eram, então, utilizados para os diferentes procedimentos experimentais.

3.1. Estudo *in vitro*

Após os procedimentos descritos acima (item 3), nos tubos contendo meio de incubação controle, hiposmótico ou hiperosmótico mais os tecidos era realizada a substituição da fase gasosa por uma mistura de O₂:CO₂ (95:5, v/v). Então, os tecidos eram incubados em banho metabólico a 25°C por 120 minutos, sob agitação constante.

3.2. Captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-Glicose

Para avaliar a captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-Glicose foram utilizados 6 animais para cada grupo experimental: 1) controle; 2) estresse hiposmótico; 3) estresse hiperosmótico. Aos meios de incubação foram adicionados 0,2μCi de 2-Deoxi-D(1-¹⁴C)-Glicose (2-DG) (GE 55mCi/mmol) por tubo. Os tecidos foram incubados, como descrito acima (item 3), por 120 minutos em tubos (tipo *ependorfs*) contendo 500μL dos diferentes meios de incubação mais a 2-DG. Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Os tecidos eram retirados e lavados com os respectivos meios de incubação (sem a 2-DG) gelados e, posteriormente, secos em papel filtro e colocados em frascos com tampa de rosca contendo 1mL de água destilada. Este procedimento tinha como objetivo retirar o excesso de radioatividade absorvida pelo tecido.

Após, os tecidos foram congelados e fervidos por três vezes consecutivas, para que ocorresse a ruptura das células e a liberação da 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-Glicose captada pelo tecido (meio interno: MI). Os tubos que continham o meio de incubação (meio externo: ME) foram congelados até o processamento das amostras. Amostras de 100μL do MI ou de ME foram colocadas, em frascos contendo 5mL de líquido de cintilação (Tolueno-Triton (2:1, v/v); PPO 0,4%; POPOP 0,01%). A radioatividade foi medida em aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos pela relação da radioatividade contida no MI e no ME, ou seja, relação tecido/meio (T/M) – cpm/mL de fluido de tecido dividido por cpm/mL do meio de incubação.

3.3. Formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-Glicose

Para avaliar a formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-Glicose foram utilizados 6 animais para cada grupo experimental: 1) controle; 2) estresse hiposmótico; 3) estresse hiperosmótico.

As amostras dos diferentes tecidos foram colocadas em frascos de vidro com tampa de borracha, contendo 1mL dos diferentes meios de incubação (controle, hiposmótico ou hiperosmótico) acrescido de 0,2μCi [U-¹⁴C]-glicose por tubo (230 mCi/mmol - GE) mais 10mM glicose. Após, os tubos eram aerados por 30 segundos com uma mistura de O₂:CO₂ (95:5 v/v). Os frascos foram fechados com tampas de borracha que eram seladas com parafilme para impedir o escape do CO₂ formado. No interior do frasco, inseridos às tampas de borracha, estavam bastões de vidro em forma de J (cachimbos) com poços. Nestes poços eram colocados pequenos pedaços de papel Watmann 3MM. As amostras foram incubadas como descrito acima (item 3.1) durante 120 minutos. Então, 0,2mL de hidróxido de sódio (NaOH) 2M foram injetados nos poços de vidro e a incubação foi interrompida com a adição

de 0,2mL de TCA 50%, injetados através da tampa de borracha com a ajuda de uma seringa. O $^{14}\text{CO}_2$ formado era captado pelo papel embebido em NaOH 2M no poço de vidro. Então, os frascos lacrados com parafilme permaneciam no laboratório, dentro de uma capela, imóveis, durante 12 horas, à temperatura ambiente, para a total captação do $^{14}\text{CO}_2$ formado (Torres *et al.*, 2001). Depois desta etapa, os bastões de vidro com o cachimbo eram transferidos para frascos contendo líquido de cintilação (Tolueno Triton X100 (2:1)-PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade determinada em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os valores da oxidação de ^{14}C -glicose foram expressos em nmol ^{14}C -glicose incorporada em $^{14}\text{CO}_2$.mg⁻¹ de tecido.tempo⁻¹ de incubação.

3.4. Síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -Glicose

Para avaliar a síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose foram utilizados 6 animais para cada grupo experimental: 1) controle; 2) estresse hiposmótico; 3) estresse hiperosmótico. Aos meios de incubação foram adicionados 0,2μCi de ^{14}C -U-Glicose (GE 55mCi/mmol) por tubo mais 10mM de glicose. Os tecidos foram incubados, como descrito acima (item 3), por 120 minutos em tubos (tipo *ependorfs*) contendo 500μL dos diferentes meios de incubação mais a ^{14}C -glicose. Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Os tecidos eram retirados e lavados com os respectivos meios de incubação (sem a ^{14}C -glicose) gelados e, posteriormente, secos em papel filtro e colocados em tubos contendo 100μL de KOH 0,5N. A lavagem, com meio de incubação gelado, era para retirar o excesso de radioatividade do tecido. A digestão dos tecidos era realizada em banho a 70°C por 30 a 40 minutos. Após a digestão dos tecidos, amostras de 50μL eram retiradas para dosagem de proteína. Ao restante (50μL) foi acrescentado: 25μL de TCA 30% + 25μL de HCl 1N para desproteíntização e neutralização, respectivamente. Após, as amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm. O sobrenadante (30μL) era aplicado em tiras de papel *Whatman 3MM*. Em uma unidade do papel não foi aplicada amostra, correspondendo ao branco. Após a aplicação, as tiras (amostras) eram colocadas em recipiente com álcool 66% por 30 minutos, para precipitação do glicogênio. Passado este tempo, as tiras eram colocadas sobre papel filtro para secar. Em frascos contendo 3mL de Tolueno, PPO 0,4%, POPOP 0,01% eram colocadas as amostras de papel e a radioatividade determinada em um contador LKB-Wallac com 97% de eficiência, calibrado com uma curva de correção para DPM. Os valores foram expressos em μmol de ^{14}C -glicose incorporada em glicogênio.mg⁻¹ de proteína.tempo⁻¹ de incubação.

3.5. Dosagem de proteínas

As proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (1976) com o *Coomassie brilliant blue*. Albumina bovina foi utilizada como padrão. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda a 595nm.

4. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão da média (Média \pm DPM). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois pontos foi feita usando-se o teste *t* de *Student* para dados não pareados. As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. As análises foram realizadas com o programa SigmaStat 3.11 (Jandel Corporation) compatível com Windows.

RESULTADOS

1. Captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-glicose em tecidos do caranguejo *Neohelice granulata*, submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*.

Nas figuras 1, 2 e 3 estão representados os efeitos dos estresses hiperosmótico e hiposmótico, *in vitro*, sobre a captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-glicose no músculo, no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores, respectivamente.

Em todos os tecidos estudados, 120 minutos de estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*, não alterou significativamente ($P>0,05$) a captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-glicose quando comparada àquela do grupo controle.

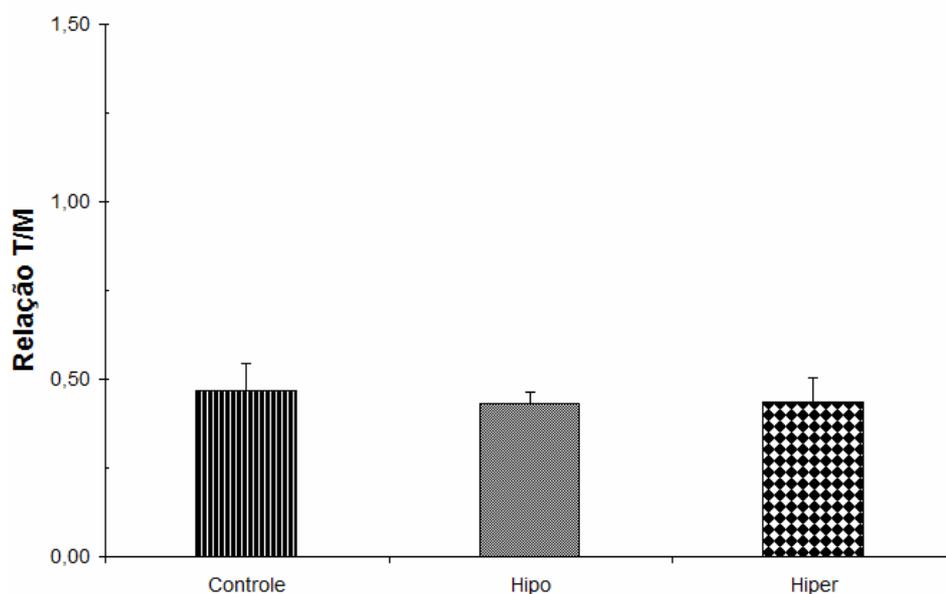


Figura 1. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*, sobre a captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-glicose em músculo da mandíbula de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DP de 6 animais por grupo.

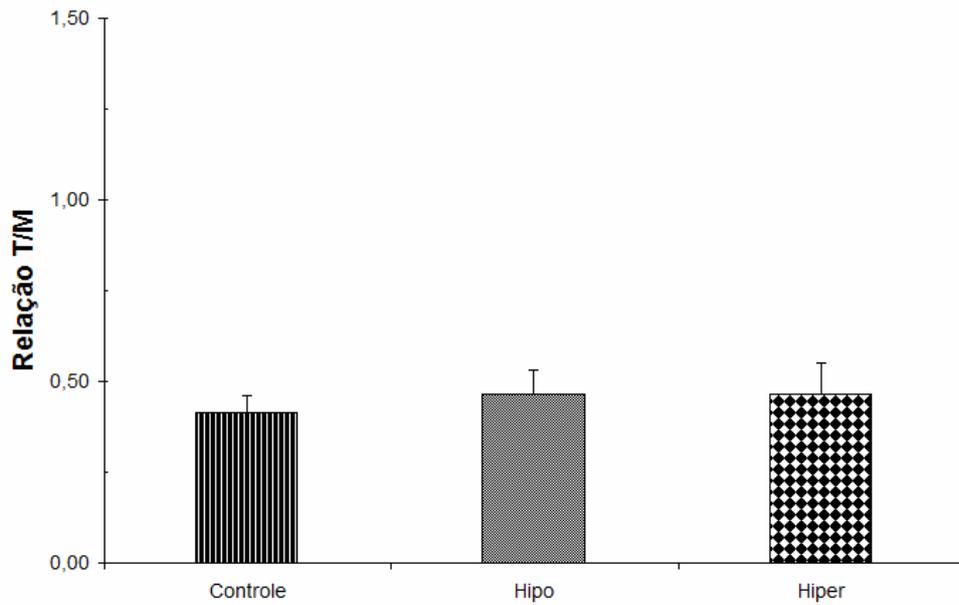
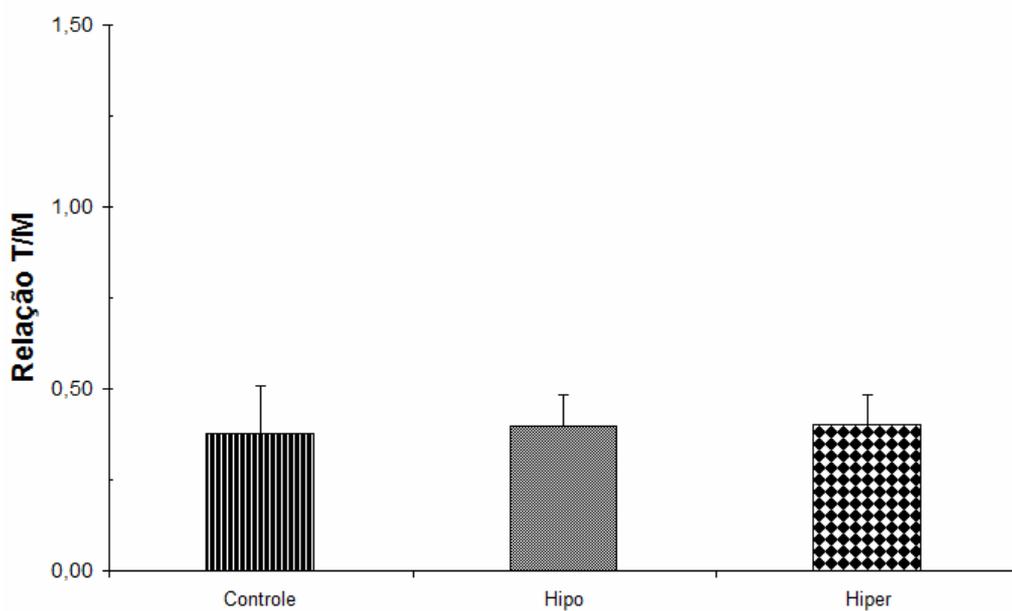


Figura 2. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*, sobre a captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-glicose no hepatopâncreas de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DP de 6 animais por grupo.

A



B

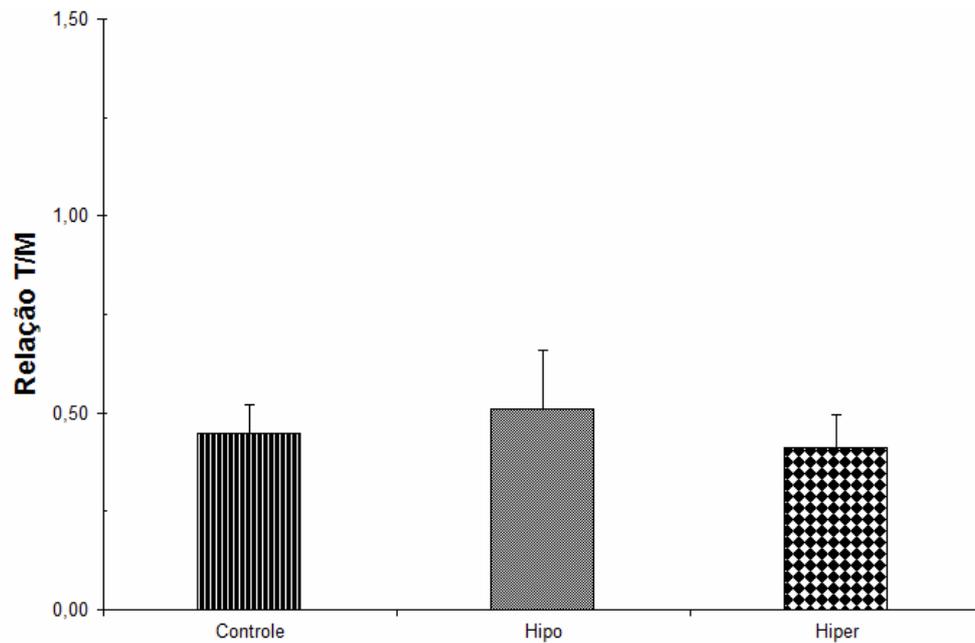


Figura 3. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*, sobre a captação de 2-Deoxi-D-(1-¹⁴C)-glicose nas brânquias anteriores (A) e posteriores (B) de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DP de 6 animais por grupo.

2. Formação de ¹⁴CO₂ a partir de Glicose-U-¹⁴C em tecidos do caranguejo *Neohelice granulata*, submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*.

Nas figuras 4, 5 e 6 estão representados os efeitos dos estresses hiperosmótico e hiposmótico, *in vitro*, sobre a formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-glicose no músculo, no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores, respectivamente.

No músculo mandibular de *N. granulata* não foram constatadas diferenças significativas (P>0,05) na formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-glicose entre os grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico durante 120 minutos e o grupo controle (Fig. 4).

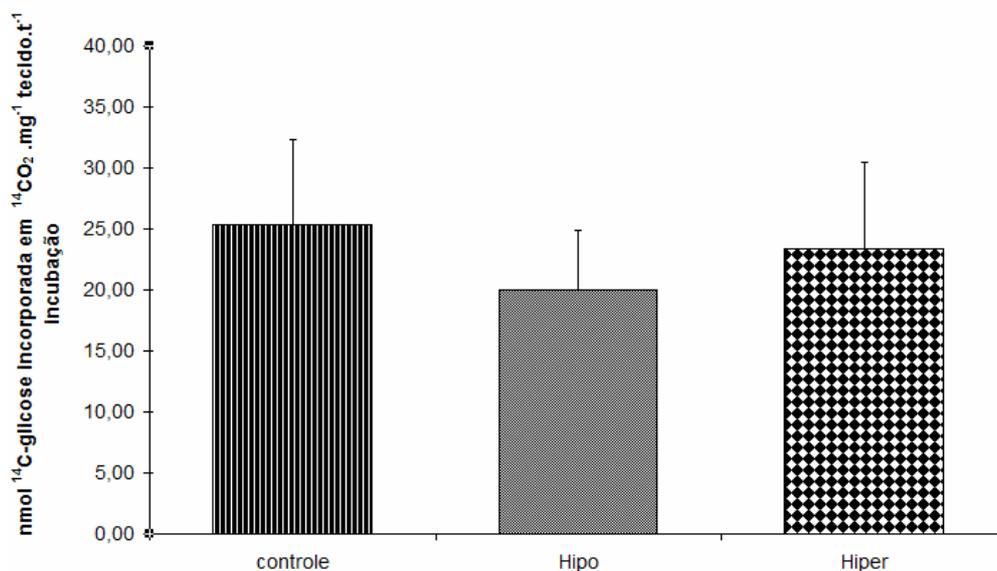


Figura 4. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico sobre a formação de ¹⁴CO₂ a partir de Glicose-U-¹⁴C no músculo da mandíbula de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DP de 6 animais por grupo.

Entretanto, após 120 minutos de estresse hiposmótico ou hiperosmótico os valores de formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-glicose no hepatopâncreas diminuíram cerca de 29% (P<0,05) quando comparados àquele obtido no grupo controle (Fig. 5).

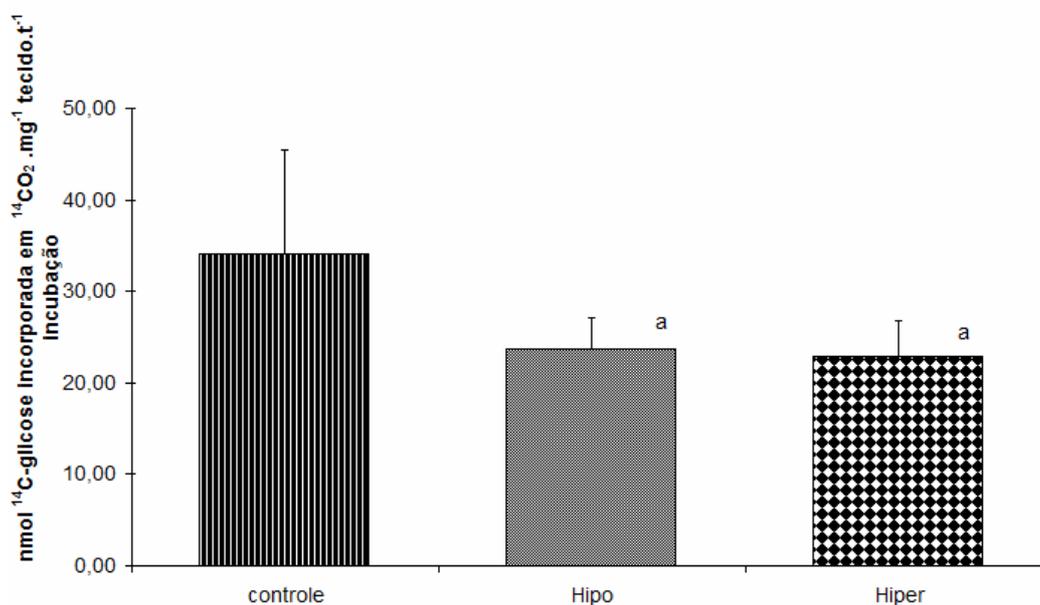
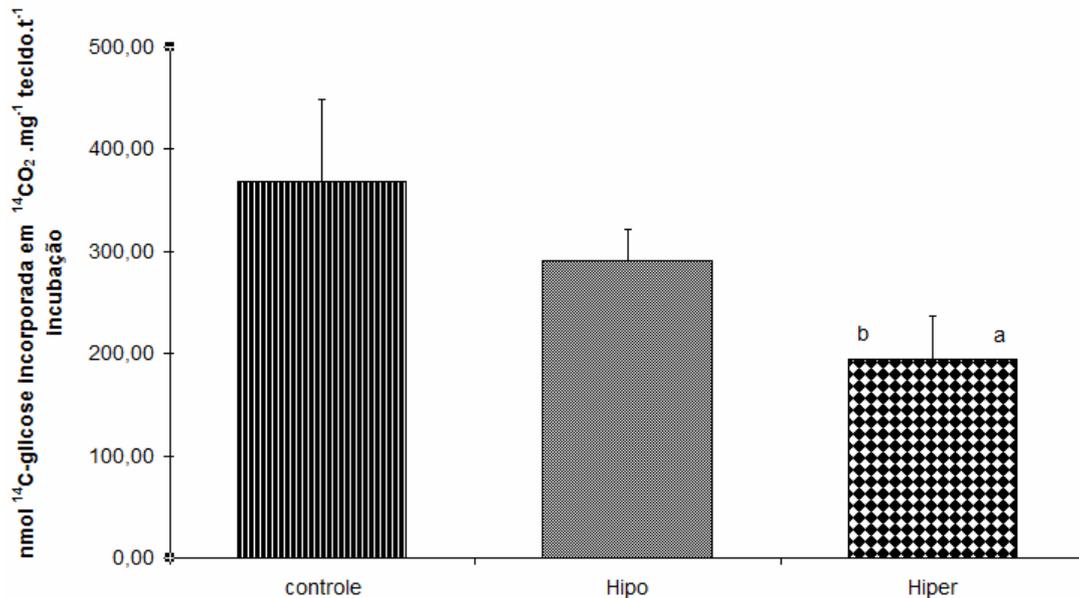


Figura 5. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico sobre a formação de ¹⁴CO₂ a partir de Glicose-U-¹⁴C no hepatopâncreas de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias ± DP de 6 animais por grupo.

a – Diferença significativa (P<0,05) em relação ao grupo controle.

Nas brânquias anteriores (Fig. 6A) o estresse hiperosmótico por 120 minutos diminuiu 46% ($P<0,05$) e 33% ($P<0,05$) a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose em relação aos grupos controle e hiposmótico, respectivamente.

A



B

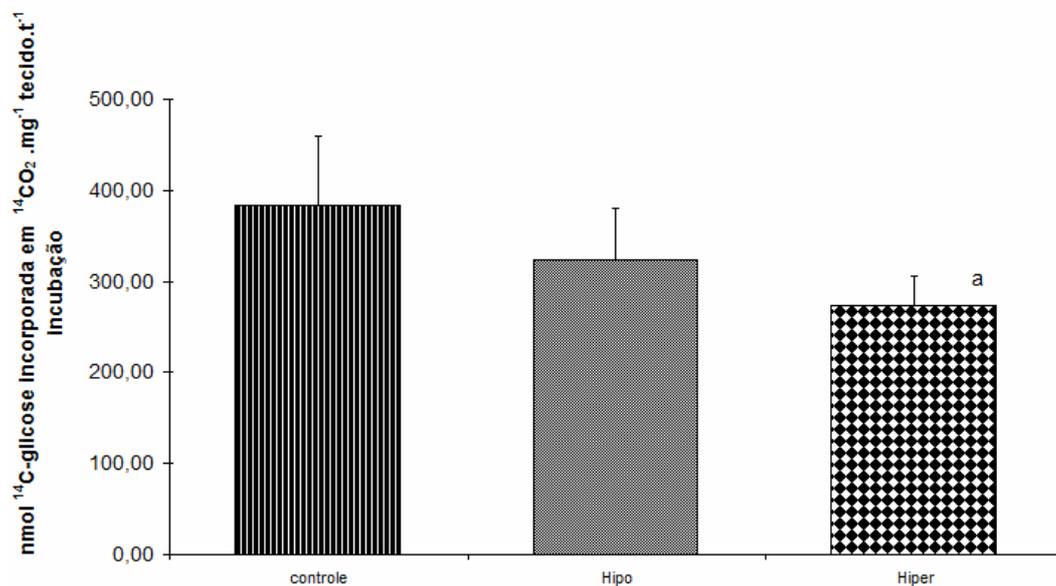


Figura 6. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico sobre a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de Glicose- ^{14}C em brânquias anteriores (A) e posteriores (B) de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DP de 6 animais por grupo.

a – Diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao grupo controle.

b – Diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao grupo hiposmótico.

O estresse hiperosmótico diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose nas brânquias posteriores (Figura 6B), em relação ao grupo controle. Entretanto, o estresse hiperosmótico de 120 minutos não alterou de forma significativa ($P > 0,05$) os valores de formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose, em relação ao grupo hiposmótico.

3. Síntese de ^{14}C -Glicogênio a partir de Glicose- ^{14}C em tecidos do caranguejo *Neohelice granulata*, submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico, *in vitro*.

Nas figuras 7, 8 e 9 estão representados os efeitos dos estresses hiperosmótico e hiposmótico, *in vitro*, sobre a síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose no músculo, no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores, respectivamente.

No músculo mandibular o estresse osmótico (hiposmótico ou hiperosmótico), *in vitro*, não alterou significativamente ($P > 0,05$) a síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose (Fig. 7).

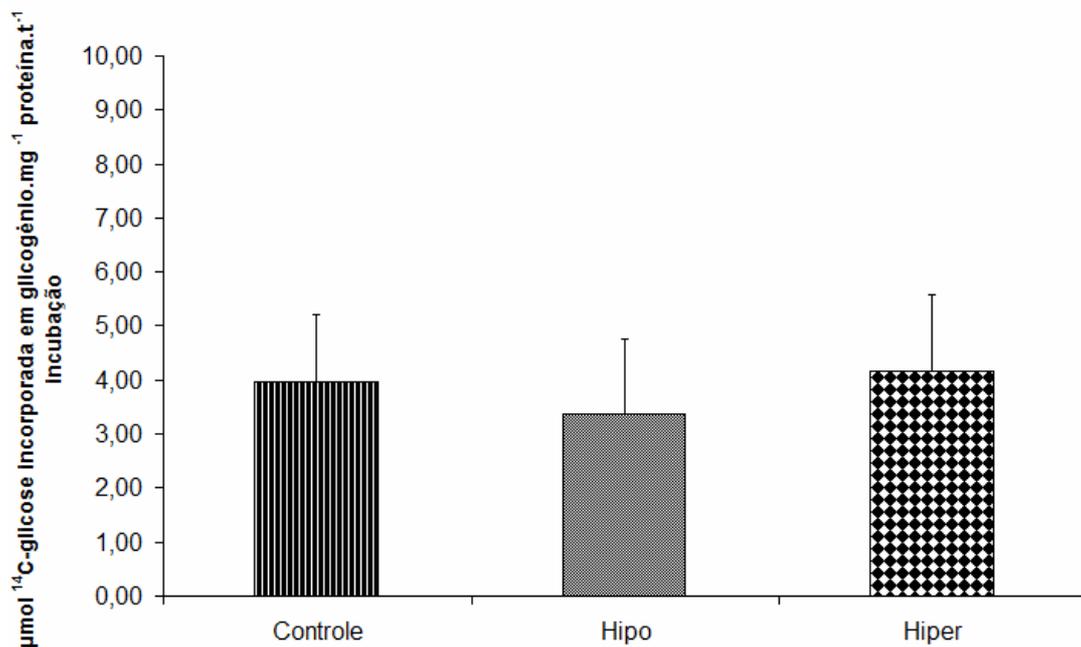


Figura 7. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico sobre a síntese de glicogênio a partir de Glicose- ^{14}C em músculo da mandíbula de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DP de 6 animais por grupo.

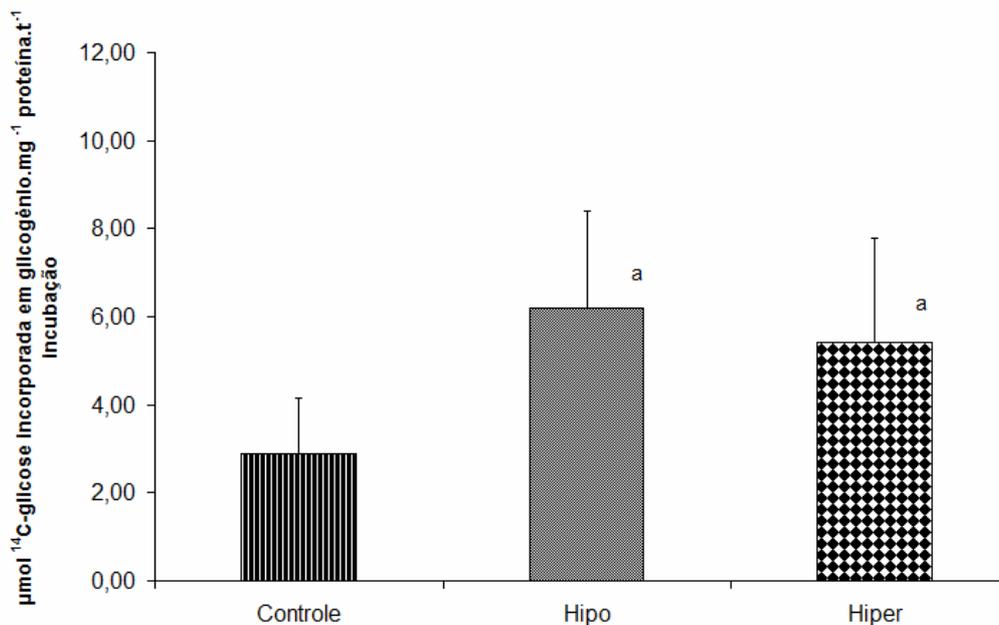
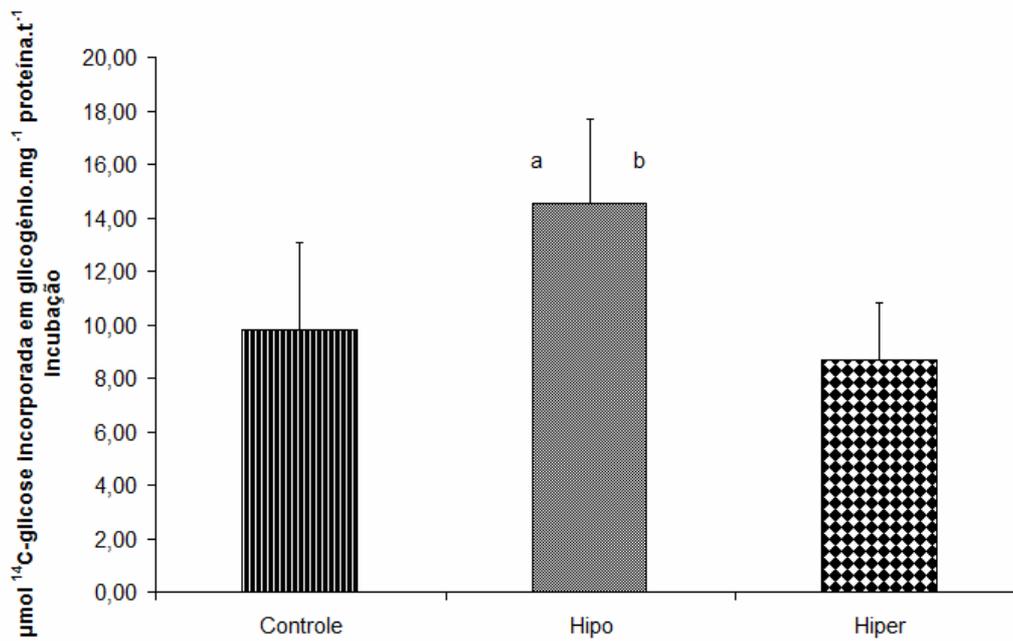


Figura 8. Efeito do estresse hiposmótico ou hiperosmótico sobre a síntese de ¹⁴C-glicogênio a partir de Glicose-U-¹⁴C em hepatopâncreas de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DP de 6 animais por grupo.

a – Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

No hepatopâncreas de *N. granulata* o estresse osmótico, *in vitro*, por 120 minutos incrementou a síntese de glicogênio (Fig. 8). O estresse hiposmótico aumentou 2 vezes e o estresse hiperosmótico 1,9 vez a capacidade de síntese de ¹⁴C-glicogênio a partir de ¹⁴C-glicose, quando comparado com aquele obtido no grupo controle (Fig. 8).

A



B

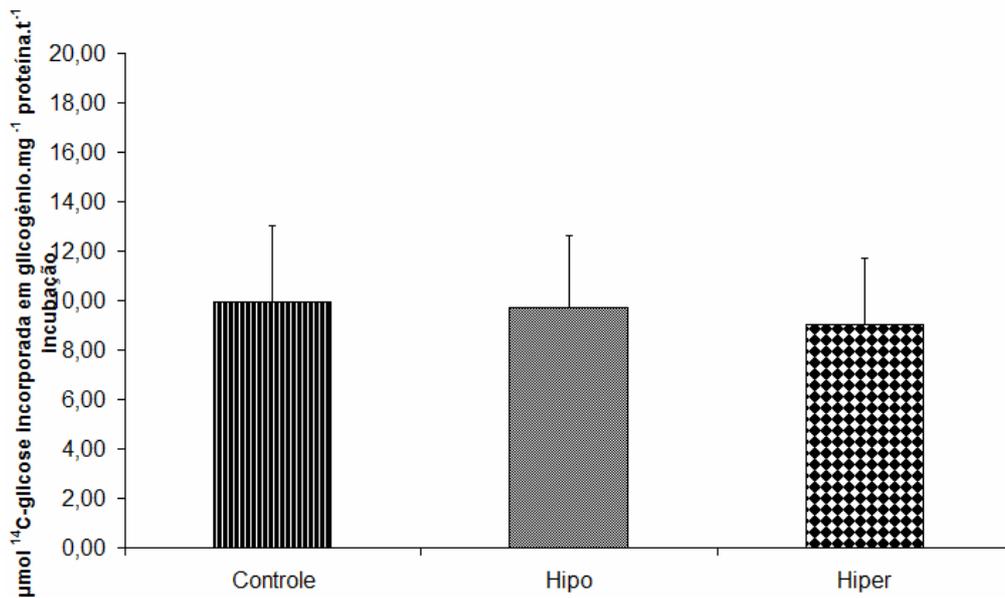


Figura 9. Efeito do estresse hiposmótico ou hipersmótico sobre a síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de Glicose-U- ^{14}C em brânquias anteriores (A) e posteriores (B) de *N. granulata*. As colunas e as barras representam, respectivamente, as médias \pm DP de 6 animais por grupo.

a – Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

b – Diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo hipersmótico.

Nas brânquias anteriores, o estresse hiposmótico por 120 minutos, aumentou cerca de 1,5 vez ($P < 0,05$), em relação aos grupos controle e hiperosmótico, a capacidade de síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose em brânquias anteriores (Fig. 9A). Contudo, o estresse hiperosmótico não alterou significativamente ($P > 0,05$) a capacidade de síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose (Fig 9A).

Em brânquias posteriores, o estresse osmótico (hipo ou hiperosmótico), *in vitro*, não alterou de forma significativa ($P > 0,05$) a síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose (Fig. 9B).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo determinar se a modificação de volume celular decorrente do estresse hiposmótico ou hiperosmótico agudo, *in vitro*, ocasionaria uma resposta do metabolismo da glicose aos ajustes resultantes da regulação isosmótica, responsável pela composição do fluido intracelular e pelo volume celular. Os resultados demonstraram que o estresse osmótico agudo, *in vitro*, induziu modificações na capacidade intrínseca de vias do metabolismo de carboidratos no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata*.

Estudos realizados em células de mamíferos mostram alguns efeitos da variação da concentração do meio extracelular sobre o volume celular. Células submetidas ao choque hiposmótico incham e, dentro de minutos, retornam parcialmente ao seu volume inicial. Esse comportamento foi denominado de redução regulatória de volume (RVD). Inversamente, a exposição ao meio hiperosmótico reduz o volume celular e, após poucos minutos, ocorre aumento regulatório do volume (RVI), retornando, após, a um volume próximo ao inicial. Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou pelo RVI podem diferir entre os vários tipos celulares, mas, em geral, envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons e de solutos orgânicos na membrana plasmática e ativação ou inibição de vias metabólicas celulares (Häussinger *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1998; Wehner *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2007).

No bivalve de água doce, *Corbicula fluminea*, a exposição do tecido muscular aos meios com diferentes osmolalidades induziu mudança de volume: no meio hiposmótico o volume do tecido muscular aumentou. Inversamente, no meio hiperosmótico, o volume tecidual diminuiu. Entretanto, uma completa recuperação não foi constatada em ambos os meios (Ruiz e Souza, 2008).

Recentemente, Freire *et al.* (2008) demonstraram em crustáceos de água doce, de estuário e de água salgada (mar) que o choque osmótico, *in vitro*, por 15 a 120 minutos, altera o peso do tecido muscular. Os autores constataram diminuição significativa no peso do tecido durante o choque hiperosmótico e marcante aumento de peso no choque hiposmótico. Esses resultados sugerem que, em crustáceos, assim como em vertebrados, ocorra alteração do volume celular em resposta ao estresse osmótico, *in vitro*.

O *Neohelice granulata* é um caranguejo eurialino que vive nas zonas intertidal e supralitoral dos estuários da costa sul do Brasil onde está exposto a diferentes desafios ambientais como variações na temperatura, no fotoperíodo, na pressão parcial de O₂, na disponibilidade e na composição do alimento e na salinidade da água (Turcato, 1990;

Kucharski e Da Silva, 1991a, b; Novo *et al.*, 2005; Bianchini *et al.*, 2008). Este caranguejo é classificado como regulador hiper-hiposmótico eurialino, suportando variações de osmolalidade do meio ambiente de 96-529mOsm/Kg de H₂O na primavera e no verão, respectivamente (Bianchini *et al.*, 2008; Valle *et al.*, 2009).

Em crustáceos, o envolvimento de fatores neuroendócrinos sobre a osmorregulação foi sugerido por Freire *et al.*, (1995) e por Eckhardt *et al.* (1995). Desta forma, o estudo do choque osmótico agudo, *in vitro*, possibilita separar as influências dos sistemas nervoso, endócrino e neuroendócrino sobre a aclimação às mudanças do meio externo.

Em brânquias de *Carcinus maenas*, Wellcomme e Devos (1991) sugerem que o transporte de glicose ocorra via GLUT4, isto é, por meio do transporte facilitado. Recentemente, em *N. granulata*, aclimatado às condições de laboratório, foi verificado que, em brânquias, o transporte de glicose ocorreria via GLUTs, como constatado em outros invertebrados (Hediger e Rhoads, 1997; Valle *et al.*, 2009). Entretanto, no músculo de *N. granulata*, os resultados obtidos sugerem que o transporte de glicose neste tecido ocorreria tanto via GLUTs como via co-transporte dependente de sódio (Valle *et al.*, 2009).

Em hepatopâncreas de crustáceos foi demonstrada a existência de transporte de glicose dependente de sódio, principalmente, em preparações da membrana do bordo em escova do epitélio hepatopancreático e em alguns tipos celulares como as células F (Verri *et al.*, 2001; Vilella *et al.*, 2003). Contudo, nas células R do hepatopâncreas, que estão envolvidas com a síntese de glicogênio e de lipídios, sendo consideradas como células “hepatic-like”, o transporte de glicose seria independente de sódio, possivelmente via GLUTs (Verri *et al.*, 2001).

A etapa inicial, que leva às alterações metabólicas durante o choque osmótico agudo, *in vitro*, seria a ativação do sistema sinalizador sensível ao estiramento que envolve os microtúbulos, os canais iônicos ou outros mecanismos de resposta volume-sensíveis (Wehner *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2007).

Os resultados do presente trabalho demonstram que o estresse osmótico (hiposmótico ou hiperosmótico), *in vitro*, não alterou a captação da 2-DG em nenhum dos tecidos estudados. Nas brânquias posteriores de *N. granulata*, submetidas ao estresse hiperosmótico ou hiposmótico, *in vivo*, por 140 horas, não foram verificadas alterações significativas na captação de 2-DG (Trapp, 2005). Já, nas brânquias anteriores, foi verificada redução significativa nos valores de captação de 2-DG, em todos os tempos (24, 72 e 144 horas) de estresse hiperosmótico estudados. Contudo, o estresse hiposmótico não alterou, significativamente, a captação desta hexose nas brânquias de *N. granulata* (Trapp, 2005).

Em *Leishmania* submetida ao choque hiperosmótico ocorreu uma diminuição na captação de 2-DG (Blum, 1996). O experimento de perfusão, *in situ*, de fígado do peixe teleosteo *Clarias batrachus* demonstrou uma diminuição do efluxo de glicose no meio hiposmótico e um aumento deste efluxo no meio hiperosmótico (Goswami e Saha, 1998). No presente trabalho foi determinada a captação de 2-DG e, portanto, não foi realizado um estudo do efluxo de glicose dos tecidos. Experimentos futuros, medindo a concentração de glicose no meio de incubação, serão esclarecedores para a determinação da alteração de efluxo de glicose dos tecidos frente às diferentes osmolalidades do meio externo.

Em *N. granulata*, a contribuição do metabolismo de carboidratos à aclimação ao meio hiposmótico ou hiperosmótico, *in vivo*, varia de acordo com a estação do ano e do tecido estudado (Nery *et al.*, 1993; Schein *et al.*, 2005). Em condições de campo, a maior captação de glicose pelas brânquias posteriores e anteriores ocorreu no verão, quando a osmolalidade do meio é a mais alta, cerca de 529mOsm/Kg de H₂O e a da hemolinfa é a mais baixa 833mOsm/Kg de H₂O (Valle *et al.*, 2009). O aumento da captação de glicose ocorreu nos meses mais quentes, quando importantes modificações no meio ambiente, no comportamento e no metabolismo do *N. granulata* são constatadas após o período de inverno, quando as atividades física e metabólica estão reduzidas (Valle *et al.*, 2009).

Kucharski *et al.* (2002) demonstraram, *in vitro*, que a insulina de mamíferos aumentou a captação de glicose nas brânquias posteriores, contudo, esta resposta apresentou uma diferença sazonal: a maior sensibilidade ao hormônio ocorreu no inverno.

Em músculo, a resposta da via gliconeogênica, da atividade e da expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase, durante o processo de aclimação ao estresse osmótico, *in vivo*, apresentou uma expressiva variação sazonal em *N. granulata* (Schein *et al.*, 2005).

Em *N. granulata*, Bianchini *et al.* (2008) sugerem que a diferença sazonal, em resposta às mudanças de salinidade, é devida às adaptações na permeabilidade iônica e no transporte ativo celular, associadas às variações sazonais na composição da membrana plasmática celular e na fisiologia dos diferentes tecidos.

Em nosso trabalho, os tecidos eram isolados de animais mantidos em condições controladas de laboratório e submetidos ao estresse osmótico agudo, *in vitro*. Desta forma, não sofriam as variações ambientais, bioquímicas e fisiológicas próprias do estresse osmótico na natureza ou *in vivo*, no laboratório. Nossos resultados sugerem que os mecanismos responsáveis pelo RVD ou pelo RVI após o estresse osmótico agudo, *in vitro*, não alteram a captação de glicose pelos tecidos de *N. granulata*. Estes dados indicam a necessidade da ação de outros fatores fisiológicos durante o estresse osmótico para que ocorra uma alteração do

transporte de glicose nos tecidos estudados. Kucharski *et al.* (2002) demonstraram que a insulina de mamíferos aumentava de forma marcante a captação de 2-DG em brânquias posteriores de *N. granulata*. Contudo, estudos utilizando traçadores transportados via sistema sódio-dependente serão necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos na captação de glicose durante o estresse osmótico agudo, *in vitro*.

Nos tecidos estudados, a comparação da capacidade de formação de $^{14}\text{CO}_2$ e de síntese de glicogênio, entre os grupos experimentais e os grupos controle, mostra que em brânquias (anteriores e posteriores) as atividades de oxidação de glicose e de síntese de glicogênio foram, marcadamente, maiores que aquelas verificadas no hepatopâncreas e no músculo. Estes resultados corroboram com a observação de que as brânquias seriam os tecidos mais ativos metabolicamente em peixes e invertebrados, seguidas do hepatopâncreas e do músculo (Lyndon e Houlihan, 1998; Bianchini *et al.*, 2008). Além disso, nas brânquias de *N. granulata*, os valores de glicogênio são bastante elevados, quando comparados àqueles verificados no hepatopâncreas e no músculo (Vinagre e Da Silva, 1992).

Os resultados do presente trabalho demonstram que o estresse hiposmótico, *in vitro*, diminuiu a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no hepatopâncreas e não alterou a atividade desta via nos outros tecidos de *N. granulata*. Contudo, após o choque hiposmótico, a capacidade de síntese de ^{14}C -glicogênio aumentou no hepatopâncreas. Como a captação de glicose no hepatopâncreas não foi inibida pelo choque hiposmótico agudo, provavelmente, a diminuição na capacidade de formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose ocorreu via inibição ou diminuição da atividade da via de oxidação de glicose. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de utilização de outro substrato energético em detrimento à glicose como, por exemplo, os lipídios. Luvizotto-Santos *et al.* (2003) constataram diminuição na concentração dos lipídios em tecidos de *N. granulata* submetidos ao estresse hiposmótico, *in vivo*. Assim, no hepatopâncreas, com a atividade de oxidação de glicose diminuída e sem alteração da capacidade de captação desta hexose, a glicose seria desviada para a via glicogênica em resposta ao choque hiposmótico agudo, *in vitro*. Contudo, experimentos futuros sobre a participação do metabolismo de lipídios em resposta ao estresse osmótico agudo, *in vitro*, serão necessários para esclarecer essa hipótese.

No teleósteo *Clarias batrachus*, quando o fígado foi perfundido, *in situ*, com solução hiposmótica por 20 minutos, ocorreu uma diminuição da atividade da forma ativa da enzima glicogênio fosforilase e um aumento da atividade da forma ativa da glicogênio sintase (Goswami e Saha, 1998). Nas brânquias anteriores não foi verificada alteração na capacidade

de oxidação de glicose no choque hiposmótico, contudo, a síntese de ^{14}C -glicogênio aumentou significativamente neste tecido. Em *N. granulata* foi constatado às 72 horas de estresse hiposmótico, *in vivo*, que os valores de glicose livre intracelular diminuíram cerca de 50% (Chittó, 2005). Este resultado sugere que, durante o estresse hiposmótico agudo, a glicose livre intracelular seria utilizada na síntese de glicogênio em resposta à modificação de volume celular. Desta forma, como ocorre em peixes, o estresse hiposmótico agudo, *in vitro*, inibiria a glicogenólise e estimularia a glicogênese no tecido branquial anterior e no hepatopâncreas.

Uma outra hipótese para o aumento da síntese de glicogênio no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores seria a de um aumento na atividade gliconeogênica durante o choque hiposmótico agudo, com o objetivo de reduzir a concentração intracelular de aminoácidos. Assim, a glicose produzida seria sintetizada em glicogênio. Oliveira e Da Silva (2000) constataram a participação da via gliconeogênica hepatopancreática na aclimação ao estresse hiposmótico, *in vivo*. As autoras sugerem que as cadeias de carbono dos aminoácidos liberados dos diferentes tecidos, durante a resposta ao estresse hiposmótico, *in vivo*, seriam utilizadas no hepatopâncreas como substrato para a via gliconeogênica.

Desta forma, estes resultados sugerem a importância do metabolismo de carboidratos hepatopancreático e branquial na regulação do volume celular em *N. granulata*.

Em brânquias posteriores, não foi constatada alteração significativa da formação de $^{14}\text{CO}_2$ e de síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -glicose em resposta ao estresse hiposmótico agudo, *in vitro*. Como, nas brânquias, a atividade de oxidação de glicose é bastante elevada, quando comparada àquela verificada nos outros tecidos, a atividade basal de oxidação seria suficiente para suprir a energia necessária ao processo osmorregulatório, durante o estresse osmótico agudo, *in vitro*.

A explicação para a resposta diferenciada, entre as brânquias posteriores e anteriores, frente ao estresse hiposmótico, seria a diferença funcional destes tecidos: as três brânquias posteriores têm um epitélio transportador de íons e as três brânquias anteriores apresentam um epitélio do tipo respiratório (Luquet *et al.* 2002; Genovese *et al.* 2004).

Os resultados aqui apresentados sugerem que, no choque hiposmótico agudo, *in vitro*, a ativação deste sistema sinalizador causa alteração do fluxo de carbono entre as diferentes vias metabólicas, diferindo entre os tecidos estudados. O efeito mais marcante seria no hepatopâncreas, considerado um tecido de reserva e de distribuição de substratos em *N. granulata*. Contudo, em *N. granulata*, a resposta ao estresse hiposmótico agudo, *in vitro*, difere daquela verificada em mamíferos, pois cada tecido apresenta um padrão diferenciado

de resposta, provavelmente, relacionado com a maior independência metabólica dos tecidos, constatada em crustáceos e outros invertebrados (Häussinger *et al.*, 1994; Lange *et al.*, 1998; Wehner *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2007).

O estresse hiperosmótico agudo, *in vitro*, diminuiu, de forma marcante, a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de glicose no hepatopâncreas, nas brânquias anteriores e posteriores, contudo, não alterou a oxidação no músculo. Em *Leishmania*, Blum (1996) constatou que o choque hiperosmótico inibiu diversas etapas da via de oxidação de glicose. Entretanto, Chittó *et al.* (2009) constataram uma diminuição significativa na concentração de lipídios totais nas brânquias e no hepatopâncreas de *N. granulata* em resposta ao estresse hiperosmótico, *in vivo*. Assim, uma hipótese para a redução da oxidação de glicose, encontrada neste trabalho, seria a da oxidação de ácidos graxos, principalmente, pelas brânquias anteriores e posteriores. Esta hipótese seria reforçada pela constatação de que a capacidade de síntese de glicogênio, a partir de glicose, não foi alterada nos tecidos branquias durante o choque hiperosmótico agudo, *in vitro*. Contudo, não se pode descartar a hipótese de redução da atividade metabólica basal em resposta a redução de volume celular induzida pelo estresse hiperosmótico agudo, *in vitro*.

No hepatopâncreas de *N. granulata*, os resultados do presente trabalho sugerem que a resposta ao estresse hiperosmótico, *in vitro*, seria semelhante àquela verificada durante o choque hiposmótico: a diminuição da oxidação de glicose levaria a um redirecionamento deste substrato para a via de síntese de glicogênio. Ao contrário do que ocorreu no fígado de peixe perfundido, *in situ* (Goswami e Saha, 1998), o estresse hiperosmótico não diminuiu a capacidade de síntese de glicogênio e, provavelmente, também não aumentou o efluxo de glicose no hepatopâncreas de *N. granulata*.

A submissão do tecido muscular ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico agudo, *in vitro*, não alterou de forma significativa as vias do metabolismo da glicose investigadas no presente trabalho. O envolvimento da via gliconeogênica muscular como estratégia para a redução da concentração intracelular de aminoácidos livres em resposta à aclimação ao estresse hiposmótico, *in vivo*, foi demonstrada por Schein *et al.* (2005). Também, neste tecido, foi constatado aumento na capacidade de síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina durante o estresse hiposmótico agudo e uma diminuição desta capacidade durante o estresse hiperosmótico agudo, *in vitro* (Bock, 2005).

Em *N. granulata*, evidências sobre o papel do músculo na manutenção dos níveis de substratos energéticos circulantes sob diferentes condições experimentais, *in vivo* (hipóxia, jejum e realimentação e estresse osmótico) foram descritas em outros estudos (Schein *et al.*, 2005; Pelegrino *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2008). Os resultados do presente trabalho sugerem

que a resposta do metabolismo da glicose ao estresse osmótico, no músculo de *N. granulata*, necessita da ação hormonal e/ou de sinalizadores endógenos que seriam liberados durante o processo de aclimação ao estresse osmótico. Assim, as alterações de volume celular não seriam suficientes para ativar ou inibir as diferentes vias envolvidas na utilização da glicose neste tecido.

Concluindo, o *N. granulata* enfrenta, em seu ambiente, mudanças sazonais e circadianas, variações de temperatura, de salinidade e de pH da água, por meio de estratégias que envolvem alterações no comportamento e nos mecanismos fisiológicos e bioquímicos celulares.

Quando os tecidos são submetidos ao estresse osmótico agudo, *in vitro*, as vias de oxidação de glicose, de síntese de glicogênio e de captação de glicose respondem de forma diferenciada conforme o tecido estudado. Esta diferença na resposta tecidual estaria relacionada com a participação de cada órgão na manutenção da homeostase em resposta ao estresse osmótico.

Comparando-se as respostas metabólicas constata-se diferenças marcantes entre o estresse hiposmótico e o hiperosmótico em um mesmo tecido, sugerindo que a alteração de volume seria um dos fatores que controla a resposta do metabolismo da glicose no processo de regulação de volume celular em *N. granulata*. Entretanto, os resultados sugerem que, no músculo, a alteração do volume celular não ativaria ou inibiria as vias do metabolismo da glicose estudadas no presente trabalho. A resposta metabólica ao estresse osmótico, neste tecido, seria controlada por fatores endógenos como hormônios ou neurormônios, entre outros.

A alteração do volume celular, decorrente do estresse osmótico agudo, *in vitro*, alterou o fluxo de carbonos nos tecidos hepatopancreático e branquial de *N. granulata*, sugerindo a participação do metabolismo de carboidratos no processo regulatório de volume celular em tecidos de caranguejos.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, C. E.; TYLER, P. A.; VARNEY, M. S. **Lipid profiles of *Nematocarcinus gracilis* a deep-sea shrimp from below the Arabian Sea oxygen minimum zone.** *Hydrobiologia*, 440:273-279, 2000.
- ATKINSON, R. J. A., TAYLOR, A. C. 1968. **Physiological ecology of burrowing decapods.** *Symposia of the Zoological Society of London* 59:201–226.
- AUGUSTO, A.; GREENE, L. J.; LAURE, H. J.; MCNAMARA, J. C. **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, 2007.
- BIANCHINI, A.; LAUER, M. M.; NERY, L. E. M.; COLARES, E. P.; MONSERRAT, J. M.; SANTOS FILHO, E. A. **Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation.** *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Volume 151, Issue 3, November 2008, 423-436.
- BLUM, J. J. (1996). **Effects of osmotic stress on metabolism, shape, and amino acid content of *Leishmania*.** *Biol. Cell* 87: 9-16.
- BOCK, C. **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, 2005.
- BOND-BUCKUP, G.; FONTOURA, N.F.; MARRONI, N.P.; KUCHARSKI, L.C.R. **O Caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia.** Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1991.
- BOTTO, J. L.; IRIGOYEN, H. P. **Bioecología de la comunidad Del cangrejal contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires.** *Sem. Latinoamericano Ecol. Bentonica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur. UNESCO*, Montevideo, Uruguay, p. 161-169, 1980.
- BRADFORD, M. **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, 1976
- BROMBERG, E. **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão.** Dissertação (Curso de Pós-graduação em Oceanografia Biológica) – Instituto de Biociências, Fundação Universidade de Rio Grande (FURG), 1992.
- CHANG, E.S. (2005) Stressed-out lobsters: **Crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins.** *Integ. Comp. Biol.* 45: 43-50.

CHITTÓ, A. L. F.; SCHEIN, V.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. **Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of *Neohelice granulata* crabs challenged by a change in external salinity.** Invertebrate Biology, 2009. In press.

CHITTÓ, A. L. F. **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

CHITTÓ, A. L. F.; 2005. **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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

D'INCAO, F.; RUFFINO, M.L.; SILVA, K.G.; BRAGA, A.C. **Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) na barra de Rio Grande, RS Atlântida, v. 12 (2), p. 85-93, 1990.**

ECKARDT, E.; PIERROT, C.; THET, P.; HERP, F. V.; DAURES, M. C.; TRILLES, J. P.; CHAMANTIER, G. **Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a sinus gland peptide.** Gen. Comp. Endocrinol. p. 99, 169-177, 1995.

FANJUL-MOLES, M. L. **Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update.** Comp. Biochem. Physiol. 142C, 390 -400, 2006.

FREIRE, C. A.; MCNAMARA, J. C.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J. **Neuroendocrine Control of Osmotic Regulation in the Freshwater Shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda): Free Amino Acid Concentrations in the Hemolymph.** General and Comparative Endocrinology 100, 83-91, 1995.

FREIRE, C. A., AMADO, E. M., SOUZA, L. R., VEIGA, M. P. T., VITULE, J. R. S., SOUZA, M. M., PRODOCIMO, V. (2008). **Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity.** Comp. Biochem. Physiol. 149: 435-446.

GARCIA, C. F.; GONZALEZ-BARO, H.; POLLERO, R. **Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *macrobrachium borellii*.** Lipids. 37(6): 581-585, 2002.

GENOVESE, G.; LUQUET, C. M.; PAZ, D. A.; ROSA, G. A.; PELLERANO, G. N. **The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus***

under hyper and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. J. Anat. V.197, p.239-246, 2004.

GILLES, R. **“Compensatory” organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives.** Comp. Biochem. Physiol. P. 279-290, 1997.

GILLES, R.; DELPIRE, E. **Variations in salinity, osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates.** In: DANTELER, W. H. Handbook of comparative physiology. p. 1523-1586, Oxford University Press, New York, Oxford: 1997.

GOSWAMI, C. G., SAHA, N. (1998). **Glucose, pyruvate and lactate efflux by the perfused liver of a teleost, *Clarias batrachus* during aniso-osmotic exposure.** Com. Biochem. Physiol. 119 A: 999-1007.

HARTNOLL, R.G. **Evolution, systematics and geographical distribution.** In: BURGGREN, W.; MCMOHAN, B. **Biology of Land Crabs.** New York: Cambridge University Press, 1988. p. 6-54.

HÄUSSINGER, D; LANG, F; GEROK, W. 1994. **Regulation of cell function by the cellular hydration state.** Am J Physiol 267: E343-E355.

HEDIGER, M.A., RHOADS, D.B., 1997. **Molecular physiology of sodium-glucose co-transporters.** Physiol. Rev. 74, 993-1026.

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

HERVANT F, RENAULT D. (2002). **Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms.** J. Exp.Biol. 205: 2079-2087.

HERVANT, F.; MATHIEU, J.; BARRE, H. **Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding.** J. Exp. Biology., v. 202, p. 3587-3595, 1999.

HERVANT, F. **The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hipogean and epigean crustaceans.** C. R. Acad. Sci. Paris (Série III) v. 319, p. 1071-1077, 1996.

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

HOFFMANN, EK; SCHETTINO, T; MARSHALL, WS (2007). **The role of volume-sensitive ion transport systems in regulation of epithelial transport.** Comp. Biochem. Physiol. 148 A: 29-43.

JOHNSTON, M.A.; DAVIES, P.S. **Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*.** Comp. Biochem. Physiol., v. 41B, p. 433-443, 1973.

KUCHARSKI, L.C.R.; DA SILVA, R.S.M. **Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851)**. Comp. Biochem. Physiol., v. 100A (3), p. 599-602, 1991a.

KUCHARSKI, L. C. R.; DA SILVA, R. S. M. **Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851)**. Comp. Biochem. Physiol. p. 215-218, 1991b.

KUCHARSKI, L. C. R. **Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus***. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, UFRGS, 1990.

KUCHARSKI, L. C.; SCHEIN, V.; CAPP, E.; DA SILVA, R. S. M. **In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata***. Gen. Comp. Endocrinol. V. 125, p. 256-236, 2002.

LALLIER, F.H.; WALSH, P.J. **Metabolism of isolated hepatopancreas cells from the blue-crab (*Callinectes sapidus*) under simulated postexercise and hypoxic conditions**. Physiol. Zool., v. 65, p. 712-723, 1992.

LANG, F; BUSCH, GL; RITTER, M; VÖLKL, H; WALDEGGER, S; GULBINS, E; HÄUSSINGER, D. 1998. **Functional significance of cell volume regulatory mechanisms**. Physiological Reviews 78: 247-273.

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

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

LUVIZOTTO-SANTOS R., LEE J.T., BRANCO Z.P., BIANCHINI A. AND NERY L.E.M. **Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (crustacea-grapsidae)**. J. Exp. Zool. 295, 200-205, 2003.

LYNDON, A. R., HOULIHAN D. F. (1998) **Gill protein turnover: Costs of adaptation**. Comp. Biochem. Physiol. 119 A: 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. Biochem. Physiol A 151, 61-65.

MAÑE-GARZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B.H.; LEYMONTE, J. **Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851**. In: Osmoregulación frente a cambios de la salinidad. Physis., Buenos Aires, v. 33A, p.163-171, 1974.

- MARQUEZE A., KUCHARSKI L.C., DA SILVA R.M.S. **Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets.** J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 332, 198-205, 2006.
- 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*.** Braz. 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 *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda).** J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323, 118-137.
- ODUM, E. P. **Ecologia.** p. 435, Rio de Janeiro: Interamericana, 1985.
- OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. **Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets.** Comp. Biochem. Physiol., v. 118A, n. 4, p. 1429-1435, 1997.
- OLIVEIRA, G. T.; DA SILVA, R. S. M. **Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulatus* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets.** Comp. Biochem. Physiol. 127B. p. 375-381, 2000.
- PASCUAL C, SÁNCHEZ A, ZENTENO E, CUZON G, GABRIELA G, BRITO R, GELABERT R, HIDALGO E, ROSAS C. (2006) **Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*.** Aquaculture 251:416-429.
- PELLEGRINO, R.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. **Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet.** Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. v. 358, n. 2, p.144-150, 2008.
- PELLEGRINO, R. **Efeito do jejum e da realimentação sobre a gliconeogênese e a neoglicogeniogênese no músculo do caranguejo *chasmagnathus granulatus* submetido previamente à dieta rica em proteínas ou carboidratos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- PIERCE, S. K. **Invertebrate cell volume control mechanisms: a coordinated use of intracellular amino acids and inorganic ions as osmotic solute.** Biol. Bull., 163, 405, 1982.
- ROSAS C, CUZON G, GAXIOLA G, LEPRIOL Y, PASCUAL C, ROSSIGNYOL J, CONTRERAS F, SANCHEZ A, VAN WORMHOUDT A. (2001). **Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels.** J Exp Mar Biol Ecol 259:1-22.
- RUIZ, J. L., SOUZA, M. M. **Osmotic stress and muscle tissue volume response of a freshwater bivalve.** Comp. Biochem. Physiol. A 151: 399-406.

SANTOS, E.A; BALDISSEROTO, B.; BIANCHINI, A.; COLARES, E.P.; NERY, L.E.M.; MANZONI, G.C. **Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851)**. Comp. Biochem. Physiol., v. 88A, n. 1, p. 21-25, 1987.

SANTOS, E. A., KELLER, R. **Effect of exposure to atmospheric air and blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH)**. Comp. Biochem. Physiol. 106A, 343-347, 1993.

SCHEIN, V. **Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica a estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851)**. Dissertação de Mestrado, UFRGS, 1999.

SCHEIN, V.; CHITTÓ, A. L. F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L. C.; WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R. S. M. **Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis phosphoenolpyruvate carboxykinase activity and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus*: seasonal differences**. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 316 (2) p. 203-212, 2005.

SCHEIN, V.; WACHE, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L. C.; WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R. M. S. **Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle**. Febs Letters 561 (1-3), p. 202-206, 2004.

THABREW, M.I.; POAT, P.C.; MUNDAY, K.A. **Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue**. Comp. Biochem. Physiol., v. 40B, p. 531-541, 1971.

TRAPP, M. **Efeitos do estresse hipo e hiperosmótico sobre as características de receptor à insulina e sobre a captação de glicose em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 2005.

TURCATO, G. S. **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na lagoa de Tramandaí-RS, Brasil**. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas – Zoologia) Instituto de Biociências, UFRGS, 1990.

VALLE, S. C., EICHLER, P., MACIEL, J.E, MACHADO G., KUCHARSKI, L.C., DA SILVA, R.S.M. (2009). **Seasonal variation in glucose and neutral amino acid uptake in the estuarine crab *Neohelice granulata***. Comp. Biochem. Physiol. 153 A: 252-257.

VAN AARDT, W.J. **Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery**. Comp. Biochem. Physiol., v. 91A, p. 299-304, 1988.

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⁺/D-glucose cotransport in isolated cells of *Marsupenaeus Japonicus* hepatopancreas.** J. Comp. Physiol. B 173, 679–686.

VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M. **Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet.** Comp. Biochem. Physiol. 102 (3), p. 579-583, 2002.

VINAGRE, A.S., 1999. 152f. **Metabolismo de carboidatos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: efeito do jejum e da realimentação e da apedunculacão sobre a adaptacão ao estresse hiposmótico.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

WALSH, P.J.; HENRY, R.P. **Activities of metabolic enzymes in the deep-water crabs *Chaceon fenneri* and *C. quinquendens* and the shallow-water crab *Callinectes sapidus*.** Marine Biology, v. 106, p. 342-346, 1990.

WELLCOMME, L.; DEVOS, P. **Energy consumption in the perfused gills of the crab euryhaline *Eriocheir sinensis* adapted to freshwater.** J. V. 257, p.aa150-159, 1991.

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.