

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – BACHARELADO

Título: Variação Sazonal do Metabolismo de *Procambarus clarkii* (Girard, 1852)

(Crustacea, Decapoda, Cambaridae) e sua relação com resistência à hipóxia.

Revista-Modelo: Comparative Biochemistry and Physiology

Aluno: Ricardo Ribeiro Nunes

Orientador: Paula Beatriz de Araujo

Co-Orientador: Guendalina Turcato de Oliveira - PUCRS

Porto Alegre, novembro de 2016

Variação Sazonal no Metabolismo de *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) e sua relação com resistência à hipóxia.

Ricardo Ribeiro Nunes¹, Guendalina Turcato Oliveira², Paula Beatriz de Araujo¹

¹Laboratório de Carcinologia, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

²Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Fisiologia da Conservação, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo

O lagostim invasor *Procambarus clarkii* foi introduzido em diversos países, causando modificações importantes nos ecossistemas. A espécie é notável por sua plasticidade ecológica, hábito generalista, reprodução rápida e resistência a diversos fatores ambientais. Entre esses fatores, destacamos a resistência à hipóxia, que em crustáceos está associada à produção de energia através de fermentação láctica. O metabolismo de fêmeas, machos reprodutivos e não-reprodutivos de *P. clarkii* coletados em São Paulo, Brasil, foi analisado na busca de variações sazonais e indicativos de resistência à hipóxia. Para tal, foram quantificados níveis de glicose, lactato e ácido úrico hemolinfáticos, bem como níveis de glicogênio, proteínas totais e TBARS e atividades das enzimas SOD e GST em brânquias e músculos do quelípodo. Os resultados mostraram aumento nos níveis de glicose e glicogênio e de atividade da SOD e GST no inverno, possivelmente indicando uma maior atividade alimentar nesse período. No verão, esses níveis mostraram declínio, resultantes da demanda energética para a

reprodução. Uma proporção maior de proteínas nos tecidos quando comparada com o glicogênio indicam uma dieta baseada no consumo de proteínas principalmente no verão e de carboidratos no inverno quando consideramos os valores de glicose na hemolinfa e de glicogênio nos tecidos estudados. Níveis de TBARS diminuíram nas brânquias no inverno, possivelmente devido ao aumento das defesas antioxidantes (SOD e GST). Adaptações à hipóxia como capacidade de manter altos níveis de lactato, glicose e ácido úrico hemolinfáticos e atividades elevadas de SOD e GST nos tecidos podem ser decorrentes do hábito escavador deste lagostim.

Palavras-Chave: espécie invasora, hipóxia, lagostim, metabolismo, sazonalidade, sistema antioxidante.

1. Introdução

O lagostim *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Crustacea, Decapoda, Cambaridae) é uma espécie nativa da América do Norte, presente na região sul dos Estados Unidos e nordeste do México. É uma espécie escavadora que constrói túneis nas margens dos lagos, com aberturas geralmente simples, mas podendo ter chaminés; a profundidade das habitações é variável, em alguns casos alcançando o lençol freático (Correia & Ferreira, 1995; Souty-Grosset *et al.*, 2014). O animal costuma sair à noite para forragear, sendo que os túneis são utilizados principalmente para evitar predação, desidratação, condições ambientais desfavoráveis e como local de proteção para fêmeas ovígeras (Gherardi *et al.*, 2000; Loureiro *et al.*, 2015A). Uma de suas características é o dimorfismo sexual (Fig.1), com machos apresentando dois fenótipos que se alternam: os machos reprodutivos (machos 1), os quais possuem o órgão copulador mais calcificado e espinhos nas bases dos 3º e 4º pares de pereiópodos; e os machos não-reprodutivos (machos 2) cuja calcificação do órgão copulador é menor e os espinhos estão ausentes. As fêmeas possuem uma estrutura chamada *annulus ventralis*, com função de receber o espermatóforo do macho. O *annulus ventralis* e a alternância de morfotipo entre os machos são características da família Cambaridae (Laufer *et al.*, 2005; Loureiro *et al.*, 2015A).

Devido a sua utilização na culinária, esta espécie foi introduzida em diversos países, podendo ser encontrada inclusive no Brasil, no estado de São Paulo onde a sua porta de entrada foi principalmente por seu uso em aquarismo (Magalhães *et al.*, 2005, Loureiro *et al.*, 2015B). *Procambarus clarkii* apresenta grande plasticidade ecológica, possuindo uma alimentação generalista, baseada no consumo de diversos animais e detritos vegetais, e possui uma alta taxa de reprodução (Cronin, 1998; Loureiro, *et al.*, 2015A). Também é resistente e capaz de tolerar um espectro amplo de diferentes

condições ambientais, como salinidade (Bissattini, 2015), temperatura (Veselý *et al.*, 2015) e concentração de oxigênio (Bonvillain *et al.*, 2012). Tais características contribuem para o sucesso do estabelecimento dessa espécie nos mais diversos ambientes.

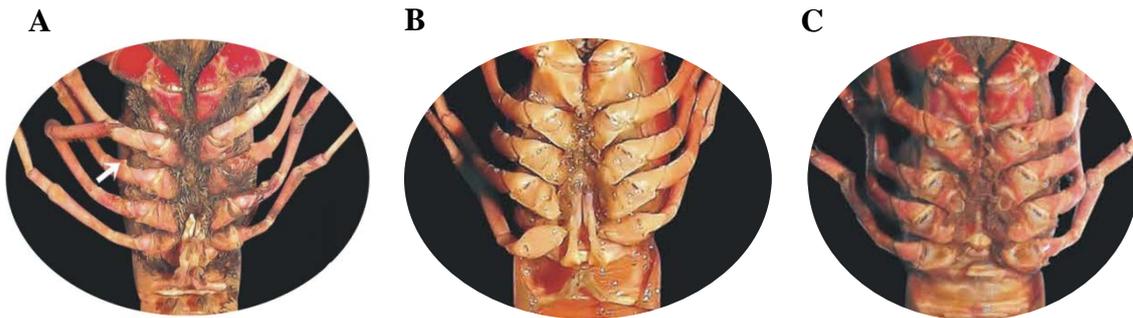


Fig. 1 - Diferentes morfotipos encontrados em *Procambarus clarkii*. **A:** Macho de morfotipo 1 (reprodutivo) com órgão copulador bastante calcificado e ganchos nos 3° e 4° pereiópodos (seta). **B:** Macho do morfotipo 2 (não-reprodutivo), com órgão copulador menos calcificado e sem ganchos nos pereiópodos. **C:** Fêmea com *annulus ventralis*, estrutura que recebe o espermatóforo. (Modificado de Loureiro *et al.*, 2015A).

A espécie tem uma capacidade de alterar os ecossistemas, uma vez que, possuindo um comportamento agressivo e uma alimentação generalista, afeta diferentes níveis tróficos das cadeias alimentares, alterando a composição de espécies e a diversidade do ambiente que invade (Loureiro *et al.*, 2015A; Rodríguez-Pérez *et al.*, 2016). Seu comportamento escavador tem implicações na turbidez da água, erosão das margens e composição de espécies de macrófitas (Rodríguez *et al.*, 2003) e, por isso, é referida como engenheira de ecossistema. Adicionalmente, *P. clarkii* é hospedeiro de diversos patógenos, podendo-se destacar o fungo de carapaça *Aphanomyces astaci*, o

qual representa uma ameaça a crustáceos nativos devido a sua letalidade (Loureiro *et al.*, 2015A; Chucholl, 2016; Peiró *et al.*, 2016).

Uma vez que na água as concentrações de oxigênio são menores do que no ar, e a difusão do gás também é mais lenta, este se torna um fator limitante para organismos aquáticos. Desta forma, são mais comuns variações de oxigênio na água, e os organismos ali presentes podem ser submetidos a períodos de hipóxia (Hill *et al.*, 2008; Moyes & Schulte, 2008). Apesar da resistência à hipóxia ser bastante variável entre os crustáceos, sendo as espécies escavadoras as mais resistentes (Vernberg, 1983; Lawniczak *et al.*, 2013), algumas estratégias são encontradas em vários grupos, especialmente em decápodos. Uma delas é a utilização do metabolismo anaeróbico, principalmente pela fermentação láctica (Childress & Seibel, 1998), uma via que inicia com a utilização de glicose para gerar 2 ATP e piruvato, este último sendo convertido à lactato. De fato, muitos crustáceos quando submetidos à hipóxia, apresentam aumento nos níveis de lactato circulantes, como em *Parastacus defossus* e *P. brasiliensis* (Silva-Castiglioni *et al.*, 2010) *Neohelice granulata* (Oliveira *et al.*, 2004) e *Cherax destructor* (Morris & Callaghan, 1998). Essa via depende de altas concentrações de glicogênio, polissacarídeo usado como reserva de glicose, que em crustáceos pode ser encontrado em diferentes órgãos e tecidos, como hepatopâncreas, músculos, brânquias, coração e hemócitos (Hochachka & Somero, 2002). Por isso, animais resistentes à hipóxia tendem a apresentar maiores concentrações de glicogênio nos seus tecidos (Childress & Seibel, 1998). Carboidratos, lipídios e proteínas podem ser utilizados como fonte de energia por caminhos aeróbios, através de sua oxidação, mas em condições de déficit ou ausência de oxigênio, os organismos são restritos ao uso de carboidratos e poucos aminoácidos como combustível fermentável (Storey e Storey, 2004). Considerando tais aspectos, as proteínas podem ser clivadas para liberação de aminoácidos, embora poucos possam ser

aproveitados em condições anaeróbicas. Os músculos constituem a principal fonte de proteínas nos crustáceos (Oliveira *et al.*, 2007; Powell & Watts, 2010), e estas também são utilizadas para formação de ácido úrico, que apesar de não ser a principal excreta nitrogenada em crustáceos, atua como um importante antioxidante não enzimático e possui um papel na regulação da afinidade da hemocianina pelo oxigênio (Morris *et al.*, 1985).

Uma vez que os níveis de oxigênio voltem a aumentar, ainda é preciso ter adaptações para evitar danos durante a reoxigenação dos tecidos, decorrentes da formação acentuada de espécies reativas de oxigênio, uma vez que nesse período a captação de oxigênio é aumentada e os tecidos possuem um grande aporte de oxigênio (Oliveira *et al.*, 2005). Outro motivo para essa formação de espécies reativas de oxigênio se deve pelo acúmulo de elétrons na mitocôndria durante a hipóxia, provindos da oxidação de produtos energéticos. Esses elétrons prontamente oxidarão o oxigênio à ânion superóxido durante a reoxigenação dos tecidos (Lawniczak *et al.*, 2013). Logo, enzimas do sistema antioxidante devem ser eficientes para proteger o organismo do dano oxidativo durante essa fase. A superóxido dismutase é uma das principais dessas enzimas, sendo responsável por metabolizar o ânion superóxido, produzindo no processo peróxido de hidrogênio, que será substrato de outras enzimas, como a catalase e a glutathione peroxidase. Em *P. clarkii*, essa enzima é mais expressa no hepatopâncreas, nos hemócitos e nas brânquias (Meng *et al.*, 2013). A enzima glutathione S-transferase atua ligando glutathione, um tripeptídeo, à moléculas potencialmente danosas, diminuindo sua toxicidade e facilitando sua excreção. Em *P. clarkii*, essa enzima está mais presente em tecidos em contato com o ambiente, como as brânquias e a glândula antenal (Almar *et al.*, 1988; Jewell *et al.*, 1989). Dentre os danos que o estresse oxidativo pode causar, a lipoperoxidação é um dos principais e mais

conhecidos, podendo ser mensurada através da quantificação de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), sendo que os níveis dessas substâncias podem representar o estado oxidativo em qual o organismo se encontra (Oakes & Van Der Kraak, 2003). Durante a fase de recuperação é necessário também reestabelecer as reservas utilizadas e eliminar ou metabolizar o lactato produzido, que em altas concentrações se torna tóxico. A eliminação pode ocorrer pela excreção; e a metabolização pela transformação do lactato de volta à substâncias de reserva, como glicogênio através da via gliconeogênica, ou pela sua completa oxidação até ATP (Ellington, 1983; Oliveira *et al.*, 2004).

Tais parâmetros fisiológicos sofrem influência de diversos fatores que não apenas hipóxia, como por exemplo, temperatura, salinidade, fotoperíodo, presença de poluentes e disponibilidade de alimento afetam o metabolismo dos animais (Kucharski & da Silva, 1991; Oliveira & da Silva, 1997; Pinheiro & Oliveira, 2016). Também, a reprodução demanda um custo elevado, e por isso esperam-se diferenças metabólicas nas estações reprodutivas; por exemplo, nessas estações as reservas de glicogênio podem ser consumidas e relocadas para as gônadas para a gametogênese e vitelogênese (no caso das fêmeas), ou então utilizadas durante períodos de cuidado parental (Oliveira *et al.*, 2007; Silva-Castiglioni *et al.*, 2007, 2012). Isso faz com que o metabolismo apresente diferenças sazonais, tanto circadianas quanto circanuais. Pode haver também diferenças entre machos e fêmeas, uma vez que o comportamento e o investimento energético na reprodução e no crescimento podem ser distintos para cada sexo (Oliveira *et al.*, 2007; Braghirolli *et al.*, 2016). Espera-se então, que tais diferenças sazonais e sexuais possam ser detectadas quando comparados os diferentes sexos e as estações mais distintas entre si: inverno e verão.

Trabalhos com *P. clarkii* mostram que a espécie é resistente a hipóxia, e que em tais condições apresentam um aumento da glicemia e lactato circulante, e respostas como aumento da afinidade da hemocianina, hiperventilação, diminuição do metabolismo e do crescimento (Mauro & Thompson, 1984; Bonvillain *et al.*, 2012; Bonvillain *et al.*, 2015). Porém, não existem informações a respeito do efeito causado em outros tecidos e em outros marcadores metabólicos, como aqueles ligados ao sistema antioxidante, que responde às condições de hipóxia/reoxigenação (Oliveira *et al.*, 2005; Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011; Lawniczak *et al.*, 2013). Logo, foi analisado neste estudo o perfil metabólico de *Procambarus clarkii* para verificar sua sazonalidade e sua relação com a resistência à hipóxia. Esses dados fornecerão informações a respeito da espécie que poderão contribuir na compreensão da invasão e delineamento de estratégias de manejo.

4. Materiais e Métodos

4.1 Local e Coleta

As coletas foram realizadas no Parque Estadual Alfredo Volpi (23°35'16''S 46°42'09''W), no município de São Paulo, em dois momentos: uma no verão e outra no inverno. Os indivíduos foram capturados com o uso de armadilhas iscadas (Fig.2), sendo utilizados 30 fêmeas, 28 machos reprodutivos (M1) e 19 machos não-reprodutivos (M2) no verão; e no inverno, 30, 13 e 20 animais, respectivamente. A concentração de oxigênio (mg/L) e a temperatura (°C) foram medidas com o uso de oxímetro, no momento de colocar (fim da tarde) e de retirar as armadilhas (manhã do dia seguinte). Foram também determinados os valores de pH com kit de pH para aquário.

Os animais capturados foram pesados com o uso de pesola (200g, com precisão 0,3mg). A hemolinfa dos animais foi retirada no local de coleta, por punção das articulações dos pereiópodos, com o uso de seringas de insulina, contendo oxalato de potássio (10%) como anticoagulante. Após a retirada da hemolinfa, os indivíduos foram sacrificados por congelamento. Posteriormente, os indivíduos foram dissecados para a retirada das brânquias e do músculo dos quelípodos. Os tecidos e a hemolinfa foram armazenados em microtubos e congelados em freezer a -20°C até a determinação dos metabólitos.

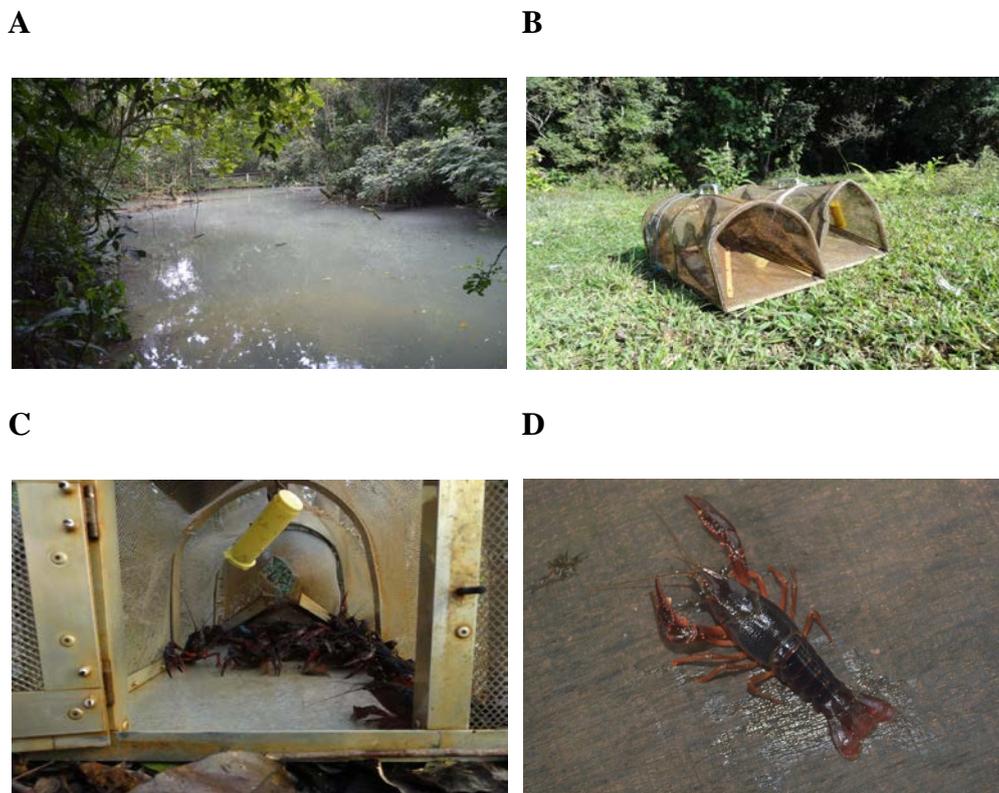


Fig. 2 – **A:** Lago do Parque Estadual Alfredo Volpi em que foi realizada a coleta. **B:** Armadilhas utilizadas na coleta. **C:** Interior da armadilha com indivíduos coletados. **D:** Indivíduo de *Procambarus clarkii* coletado (Fotos A e D de Artur Antunes Valgas e fotos B e C de Tainã Gonçalves Loureiro).

4.2 Quantificação dos Metabólitos

Foram utilizados kits comerciais para a determinação dos níveis de metabólitos na hemolinfa (glicose, lactato e ácido úrico de todos os indivíduos) e nos tecidos (10 indivíduos para glicogênio e proteínas totais e 10 indivíduos para parâmetros do balanço oxidativo), por uso de espectrofotômetro (CARY 3E-UV-Visible Spectrophotometer system- Varian). Os marcadores na hemolinfa foram analisados em simplicata, nas brânquias em duplicata, e nos músculos dos quelípodos foram agrupados em pools contendo todos os indivíduos para cada categoria e quantificados em quintuplicata.

4.2.1 Glicose

Os níveis de glicose foram determinados através do método da glicose oxidase, que catalisa a reação da glicose formando peróxido de hidrogênio. Este reage com o 4-aminoantipirina a fenol através da ação de uma peroxidase, formando uma antipirilquinona de coloração vermelha, que é proporcional a quantidade de glicose (Kit BioTécnica). A glicose foi expressa em mg/dL de hemolinfa.

4.2.2 Lactato

Os níveis de lactato foram obtidos utilizando-se a desidrogenase láctica (LDH) para catalisar a transformação de lactato a piruvato, processo onde o NAD^+ é reduzido à NADH. O aumento da absorbância pela formação do NADH é usado para medir a quantidade de lactato (Kit BioTécnica). O lactato foi expresso em mmol/L de hemolinfa.

4.2.3 Ácido Úrico

O ácido úrico foi medido pela sua oxidação pela uricase a alantoina e peróxido de hidrogênio, sendo que este último, na presença da peroxidase, reage com o DHBS e a 4-aminoantipirina formando antipirilquinonimina. Esta produz uma cor vermelha de intensidade proporcional à quantidade de ácido úrico (Kit BioTécnica), e este foi expresso em mg/dL de hemolinfa.

4.2.4 Glicogênio

O glicogênio foi extraído conforme o método de Van Handel (1965) e quantificado como glicose, após hidrólise ácida em HCl e neutralização com Na₂CO₃, através do método da glicose oxidase, com uso de kit comercial da BioTécnica. O glicogênio foi expresso em mg/g de peso úmido.

4.2.5 Balanço Oxidativo

Os tecidos foram homogeneizados, com uso de Turrax, em solução de tampão fosfato (20mM) contendo um inibidor de proteases em uma concentração final de 1mM de fenil metilsulfonyl fluoridre (PMSF), em uma proporção de 1g de tecido para 5ml de tampão. O homogeneizado foi centrifugado (SORVALL RC-5B) a 3000xrpm por 10min à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi separado em alíquotas em microtubos de acordo com cada procedimento.

- 1) **Dosagem de proteínas totais:** Foram quantificadas, no homogeneizado, através da reação de íons cobre com as ligações peptídicas das proteínas (mg/mL de meio), em um meio de reação alcalino, formando um líquido de coloração púrpura (Kit Biotécnica). A mesma técnica foi utilizada para determinar os níveis de proteínas

totais nos tecidos (mg/g de peso úmido) que não foram homogeneizados para análise de balanço oxidativo.

- 2) **Superóxido dismutase (SOD):** A determinação da SOD foi baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. Visto que não é possível determinar a concentração da enzima nem sua atividade pela análise de substrato consumido ao longo do tempo, considera-se que uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (adrenalina). A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo. A atividade da SOD é determinada medindo a velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH (50mM, pH 10) e adrenalina (1mM), e expressa em U/mg proteínas.min (Boveris & Cadenas, 1982).
- 3) **Glutathione S-transferase:** Sua atividade foi determinada pela medida da conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH). A atividade produz um aumento nos valores da absorbância a 340 nm. A atividade da enzima é expressa como μmol de conjugado CNDB/mg proteínas.min (Boylard & Chasseaud, 1969).
- 4) **Medida de Lipoperoxidação:** O material biótico foi incubado em um meio ácido e aquecido a temperaturas de 100°C, na presença de ácido tiobarbitúrico (TBA). A condensação de substâncias reativas ao TBA, forma produtos que podem ser mensurados a 535 nm. A concentração de TBARS foi expressa em $\mu\text{moles/mg}$ proteína (Buege & Aust, 1978).

4.3 Análise dos dados

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e para determinar diferenças entre as categorias de um mesmo tecido foi utilizado, para dados paramétricos, o teste ANOVA com complementar de Tukey, e para dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis com complementar de Dunn. Os resultados foram considerados significativamente diferentes para um $p < 0,05$. Todos os testes foram executados no Bioestat 5.0.

5. Resultados e Discussão

Os valores de concentração de oxigênio observados não atingiram níveis considerados de hipóxia ($< 2 \text{mg/dL}$, segundo Bonvillain *et. al*, 2012), mas apresentaram flutuações ao longo do dia, principalmente no verão. O pH não apresentou variação ao longo do dia ou das estações do ano, e a temperatura da água variou pouco ao longo do dia, mas foi mais alta no verão (Tab.1). Era esperada uma menor concentração de oxigênio no verão, uma vez que as temperaturas mais elevadas diminuem a solubilidade do oxigênio na água (Hill *et al.*, 2008; Moyes & Schulte, 2008). Porém, essa mesma propriedade pode explicar porque nessa estação as flutuações são maiores durante o dia.

Tab. 1 – Fatores abióticos da água, medidos no verão e no inverno. A tarde representa o momento em que as armadilhas foram colocadas e a manhã a sua retirada.

	Verão		Inverno	
	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã
pH	6,2	6,2	6,2	6,2
Temperatura (°C)	23,5	22,0	16,9	16,7
Concentração de Oxigênio (mg/L)	4,59	10,54	7,85	7,65

Os níveis de glicose circulante observados em todas as estações (verão e inverno) assim como, para todas as categorias reprodutivas (F: fêmeas, M1: machos reprodutivos e M2: não reprodutivos) foram cerca de 10 vezes maiores que aqueles observados para espécies nativas de lagostins, *Parastacus brasiliensis* e *P. defossus* por Silva-Castiglioni *et al.* (2012) e para *P. brasiliensis promatensis* por Pinheiro e Oliveira (2016B).

Os níveis de glicose na hemolinfa tiveram um aumento no inverno, em fêmeas ($p < 0,01$) e machos 2 ($p < 0,05$). A hiperglicemia é uma resposta comum em muitos crustáceos que enfrentam hipóxia, sendo uma preparação para a demanda de glicose no metabolismo anaeróbico, e já foi observada em *Procambarus clarkii* (Bonvillain *et al.*, 2012; Bonvillain *et al.*, 2015). Contudo, não foi observada uma diminuição nos níveis de oxigênio dissolvido na água o que nos permite sugerir um aumento da atividade alimentar/digestória, resultando assim, em uma maior disponibilidade de glicose circulante e maior captação deste monossacarídeo nos tecidos para ser usado na síntese de glicogênio. Cabe ressaltar que tal hipótese é reforçada pelos níveis mais elevados de glicogênio encontrados tanto nos quelípodos como nas brânquias, nestas mesmas categorias (fêmeas e machos 2) e neste mesmo período do ano. Valgas *et al.* (2016) mostram um maior grau de repleção gástrica no inverno, em fêmeas e machos-2 desta mesma espécie, coletados no mesmo local deste estudo, reforçando nossa hipótese.

Já os machos 1 (reprodutivos) mostraram uma manutenção dos níveis glicose na hemolinfa e glicogênio no quelípodo quando comparamos as médias obtidas para os meses de verão e de inverno. Podemos assim observar que fêmeas e machos 2 (não reprodutivos) se comportam de maneira semelhante, apresentando altos níveis de glicose hemolinfática e de glicogênio no músculo dos quelípodos; assim, as fêmeas e os machos 2 manteriam um alto grau de atividade exploratória do hábitat para obtenção de

alimento e alocação destes nutrientes para sustentarem o pico reprodutivo observado no verão. Valgas *et al.* (2016) mostram que a reprodução estende-se por todo o ano tendo um pico nos meses de verão, tendo estes autores encontrado um maior índice gonadossomático, um menor índice hepatossomático, além de uma predominância de ovários maduros.

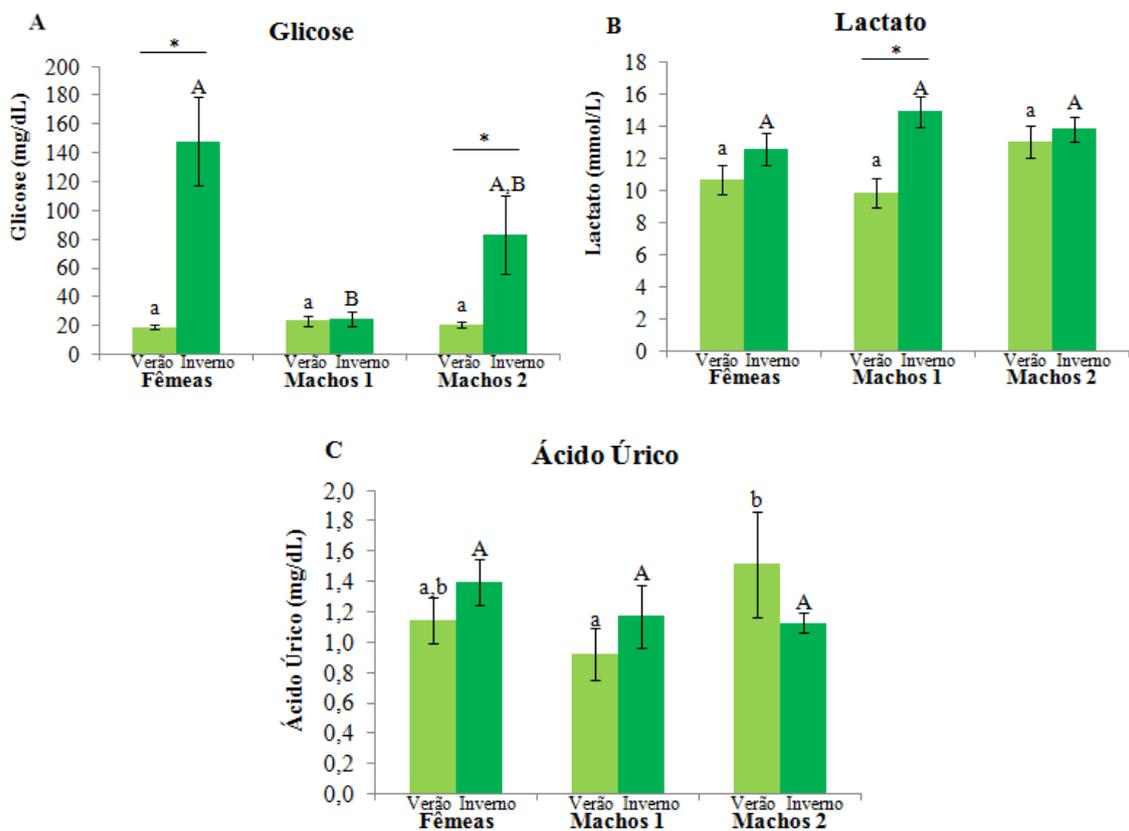


Fig. 3 – Valores dos metabólitos circulantes na hemolinfa no verão e no inverno, representados como média±erro padrão. Colunas representadas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre as categorias, sendo letras minúsculas = verão e letras maiúsculas = inverno. Colunas marcadas com asterisco diferiram estatisticamente entre verão e inverno. Foi considerado significativo valores de $p < 0,05$. **A:** Níveis de glicose circulante em mg/dL de hemolinfa. **B:** Níveis de lactato circulante em mmol/L de hemolinfa. **C:** Níveis de ácido úrico circulante em mg/dL de hemolinfa.

Parâmetros do metabolismo intermediário, como glicose, proteínas e diferentes tipos de lipídios são determinados pelo equilíbrio entre o anabolismo/catabolismo nos diferentes órgãos, por parâmetros da capacidade de digestão/absorção através do trato gastrointestinal e por parâmetros de excreção através do sistema excretor (Silva-Castiglioni *et al.*, 2015). Segundo os mesmos autores, os nutrientes e metabólitos hemolinfáticos ou sanguíneos têm valor comprovado como marcadores diretos e efetivos para a estimativa do estado nutricional de aves, peixes, mamíferos, crustáceos e outros animais. Estes marcadores também podem ser úteis para a avaliação da associação entre o estado nutricional e a atividade alimentar em lagostins (Silva-Castiglioni *et al.*, 2012; Pinheiro & Oliveira, 2016B).

Os níveis de lactato circulantes não diferiram entre as categorias, apresentando níveis altos em ambas as estações, mas tendendo a aumentar no inverno e mostrando diferença estatística somente nos machos 1 ($p < 0,01$) nesta estação (Fig. 3B). Os níveis de lactato variaram entre 10 e 16 mmol/L nestes animais sendo de 3 a 5 vezes maiores que aqueles observados em *Parastacus defossus* e *P. brasiliensis*, respectivamente, quando submetidos à hipóxia ambiental por 8h (Silva-Castiglioni *et al.*, 2010), mas semelhante aos observados por Pinheiro e Oliveira (2016B) para *P. brasiliensis promatensis* coletados em meio hipóxico.

Altos níveis de lactato estão associados com a utilização de metabolismo anaeróbico, que pode ser uma resposta à hipóxia, como demonstrado para vários crustáceos, incluindo *Procambarus clarkii* (Mauro & Thompson, 1984; Bonvillain *et al.*, 2012; Bonvillain *et al.*, 2015). Adicionalmente, segundo Bonvillain *et al.* (2012), o lactato pode atuar aumentando a afinidade da hemocianina por oxigênio. Logo, a capacidade de manter níveis altos de lactato na hemolinfa confere ao animal melhores condições para resistir à hipóxia. A partir dos achados para os níveis de oxigênio

dissolvido na água que apresentaram valores médios ao redor de 7,7 mg de O₂/L em todo período de estudo podemos supor que os animais não estavam sujeitos à hipóxia no ambiente de coleta, logo, outros fatores poderiam estar causando esse incremento nos níveis de lactato. Por exemplo, Fanjul-Moles *et al.* (1998) demonstraram que a alta incidência de luz e fotoperíodo longo causam aumento dos níveis de lactato em *Procambarus clarkii* e *P. digueti* em condições laboratoriais. Além disso, mesmo em ambientes hipóxicos, *P. clarkii* poderia ser capaz de evitar a acumulação de lactato através de algumas adaptações. Uma delas é o fato de tricobrânquias não colapsarem no ar, logo, o animal pode suplementar sua oxigenação saindo totalmente ou parcialmente da água e usar o ar como fonte de oxigênio por um período de tempo (McMahon & Wilkes, 1983; McMahon & Stuart, 1999). Também é reportado que a presença de macrófitas pode criar microambientes com concentração de oxigênio mais elevada (Miranda *et al.*, 2000; Bunch *et al.*, 2010), o que em conjunto poderia determinar apenas esta tendência ou pequeno incremento dos níveis de lactato observado neste estudo nos meses de inverno.

Não houve variação significativa dos níveis de ácido úrico circulante entre as estações, mas, no verão, estes foram maiores nos machos 2 quando comparados com os machos 1 ($p < 0,05$) (Fig. 3C). A manutenção de níveis altos de ácido úrico circulantes pode conferir uma maior resistência à hipóxia, uma vez que atua como um antioxidante não-enzimático e aumenta a afinidade da hemocianina por oxigênio (Morris *et al.*, 1985).

Valores extremamente baixos de glicogênio no verão, tanto no músculo dos quelípodos como nas brânquias em fêmeas e machos 1 (reprodutivos) reforçam a hipótese de Valgas *et al.* (2016) de ocorrência do pico reprodutivo nos meses de verão; assim, os baixos níveis de glicogênio podem refletir uma alocação desses recursos para

as gônadas (fêmeas e machos) ou para sustentar atividade exploratória de procura de parceiras reprodutivas nos machos (Oliveira *et al.*, 2007; Silva-Castiglioni *et al.*, 2007, 2012; Pinheiro & Oliveira, 2016). Já nos machos 2 (não reprodutivos), a diminuição deste polissacarídeo nesta mesma estação pode estar relacionada ao aumento de encontros e possíveis interações agonísticas com os machos reprodutivos (morfotipo 1). As reservas de glicogênio diferiram entre as categorias somente no inverno e nos músculos, sendo menores nos machos 1 e maiores nos machos 2 ($p < 0,05$); e as fêmeas não diferiram de nenhum dos morfotipos de machos. As reservas de glicogênio aumentaram nas brânquias no inverno em todas as categorias ($p < 0,01$) (Fig. 4 A e B) refletindo possivelmente, uma maior atividade alimentar como sugerido anteriormente. Cabe ressaltar também, que muitos trabalhos mostram que espécies escavadoras, resistentes à hipóxia, em geral apresentam maiores quantidades de glicogênio nos seus tecidos quando comparadas com espécies não escavadoras (Lawniczak *et al.*, 2013; Silva-Castiglioni *et al.*, 2010).

As reservas de proteínas não diferiram entre os morfotipos em nenhuma das estações, mas foram sempre maiores nos músculos do que nas brânquias o que parece refletir características funcionais distintas entre estes tecidos. Sabe-se que o tecido muscular é composto principalmente de proteínas e é responsável pela provisão da força contrátil ao movimento (Hill *et al.*, 2008; Moyes & Schulte, 2008). Sabendo que o estresse leva ao catabolismo de proteínas, como forma de suprir a elevada demanda energética da qual o corpo está necessitando (Sahib *et al.*, 1984); sendo assim, um tecido de baixa taxa metabólica. Além disso, as reservas tenderam a aumentar nos músculos no inverno, mas apresentaram diferença estatística somente nos machos 2 ($p < 0,01$) (Fig. 4 C e D). O aumento de proteínas nos músculos de machos-2 nos meses de inverno, período que precede o pico reprodutivo da espécie (verão) pode estar

relacionado com a necessidade de, no período de reprodução, os animais terem de sustentar uma maior demanda metabólica em função do aumento da competição por alimento/território em consequência da presença de um maior número de machos reprodutivos explorando o ambiente.

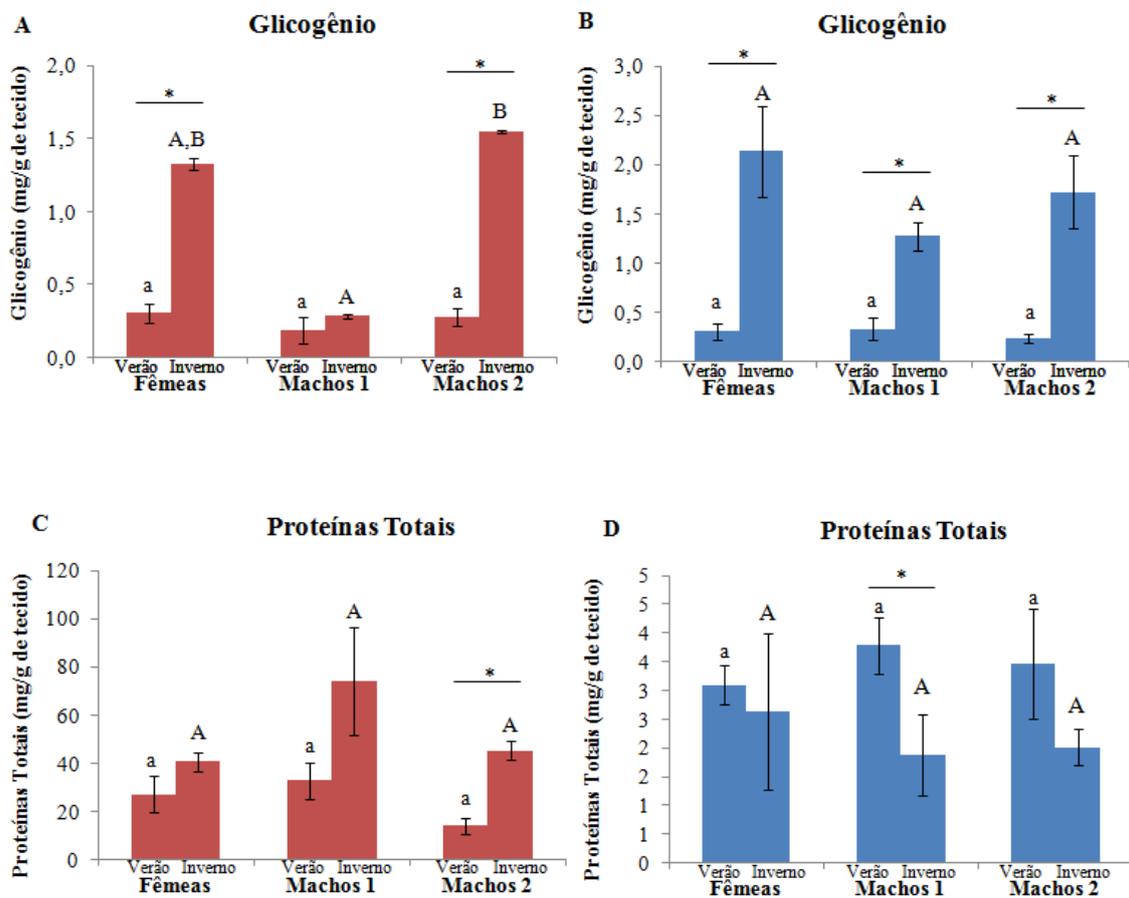


Fig. 4 – Valores de metabólitos em brânquias (azul) e músculo do quelípedo (vermelho) no verão e no inverno, representados como média±erro padrão. Colunas representadas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre as categorias, sendo letras minúsculas = verão e letras maiúsculas = inverno. Colunas marcadas com asterisco diferiram estatisticamente entre verão e inverno. Foi considerado significativo valores de $p < 0,05$. **A:** Níveis de glicogênio em mg/g de peso úmido em músculos do quelípedo **B:** Níveis de glicogênio mg/g de peso úmido em brânquias **C:** Níveis de proteínas totais em mg/g de peso úmido em músculos do quelípedo. **C:** Níveis de proteínas totais em mg/g de peso úmido em brânquias.

Já nas brânquias este padrão é invertido, onde os menores valores de proteínas totais são verificados no inverno, mas apenas os machos 1 apresentam uma redução significativa ($p < 0,05$) em relação aos meses de verão, podendo relacionar-se ao incremento de lactato plasmático verificado nesta categoria e nesta estação do ano.

Uma quantidade proporcionalmente maior de proteínas nos tecidos quando comparada com o glicogênio podem indicar que *P. clarkii* tem uma dieta baseada no consumo de proteínas principalmente no verão e de carboidratos no inverno quando consideramos os valores de glicose na hemolinfa e de glicogênio nos tecidos estudados. Os altos níveis de glicose circulante (20mg/dL até 140mg/dL), aliados a pouca variação de proteínas totais nos tecidos estudados sugerem que estes animais exploram uma dieta a base de carboidratos. Concentrações similares de glicose hemolinfática foram observadas no caranguejo do estuário *Neohelice granulata* mantido por 15 dias com uma dieta rica em carboidratos (Kucharski & da Silva, 1991 e Oliveira & da Silva, 1997). Esta associação é reforçada pelo hábito alimentar desta, visto que *Procambarus clarkii* é um animal de comportamento agressivo com hábito alimentar onívoro detritívoro, podendo se alimentar de detritos microbianos, macroinvertebrados bentônicos e planctônicos, algas, plantas suculentas, peixes e larvas de anfíbios (Huner *et al.*, 1995; Barbieri *et al.*, 2000; Loureiro *et al.*, 2015A).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi mais elevada nas brânquias das fêmeas no verão ($p < 0,01$), e no inverno as brânquias das fêmeas e dos machos 1 apresentaram atividades maiores que aquelas verificadas em machos 2 ($p < 0,01$). Nos músculos, machos 2 apresentaram as maiores atividades no verão ($p < 0,01$). No inverno, os machos 1 apresentaram as maiores atividades, as fêmeas um nível de atividade intermediário e os machos 2 as menores atividades ($p < 0,01$). No inverno, fêmeas e machos 1 tiveram um aumento e machos 2 uma diminuição da atividade em ambos os

tecidos. (Fig. 6A e B). A enzima GST também apresentou maior atividade nas brânquias de fêmeas ($p < 0,05$) (exceto na comparação com machos-2 no verão) e nos músculos do quelípodo dos machos 2 em ambas as estações ($p < 0,01$). A enzima aumentou sua atividade no inverno em todos os tecidos de todas as categorias ($p < 0,05$), exceto nos músculos do quelípodo de machos 2. (Fig. 6B e C).

Para todos os parâmetros de balanço oxidativo analisados (SOD, GST e TBARS) (Fig.6), o tecido branquial sempre tende a ter valores maiores que aqueles verificados para o tecido muscular do quelípodo; tal perfil de resposta deve estar associado ao papel fisiológico deste órgão, visto que o epitélio branquial é responsável pela respiração, eliminação de nitrogênio excretado, osmoregulação e outras funções diretamente relacionadas com a sobrevivência do animal (Hill *et al.*, 2008; Moyes & Schulte, 2008); estando em contato direto com o meio ambiente e podendo assim refletir de forma direta alterações na qualidade da água (Hochachka *et al.*, 1970; Almar *et al.*, 1988; Jewell *et al.*, 1989; Meng *et al.*, 2013). Além deste perfil, também observamos um incremento da atividade da SOD (fêmeas e machos 1) e GST (fêmeas, machos 1 e 2) nos meses de inverno neste tecido onde, como já suposto, os animais parecem incrementar sua atividade exploratória no habitat possivelmente visando a alimentação; não podemos descartar também, a ocorrência de uma alteração na qualidade da água ou em interações bióticas. A atividade das enzimas estudadas (SOD e GST) apresentam um claro padrão de variação estacional como já verificado para outros crustáceos de ambiente límnic por Braghirolli *et al.*, (2016) em anfípodos e por, Pinheiro e Oliveira (2016A) em uma espécie de lagostim.

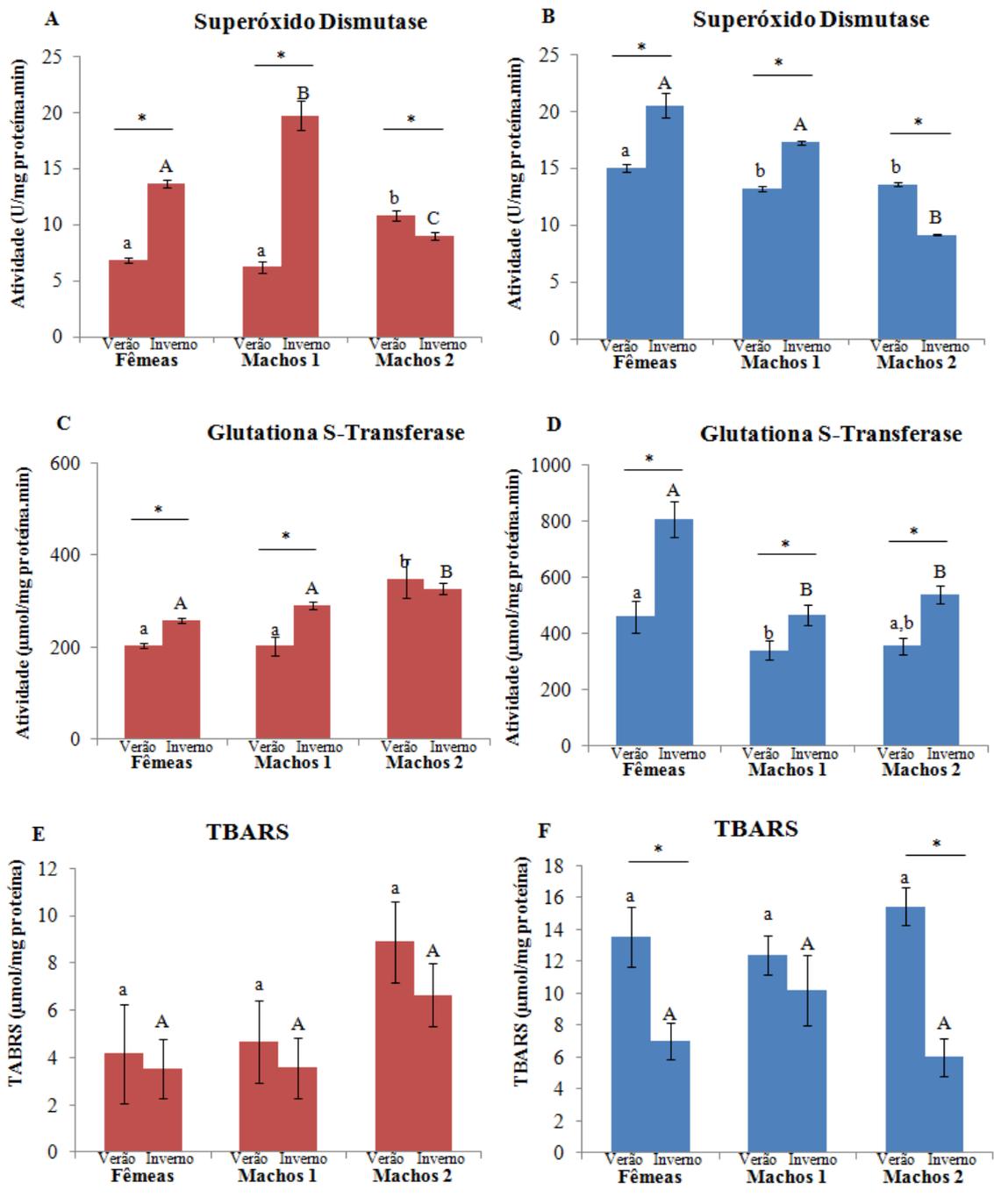


Fig. 6 – Resultados das análises de balanço oxidativo em brânquias (azul) e músculo do quelípedo (vermelho) no verão e inverno, representados como média±erro padrão. Colunas representadas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre as categorias, sendo letras minúsculas = verão e letras maiúsculas = inverno. Colunas marcadas com asterisco diferiram estatisticamente entre verão e inverno. Foi considerado significante valores de $p < 0,05$. **A:** Atividade da superóxido-dismutase (SOD) em músculo de quelípedo, em U/mg proteína.min, sendo U = a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (adrenalina). **A:** Atividade da superóxido-dismutase (SOD) em brânquias, em U/mg proteína.min, **C:** Atividade da glutaciona S-transferase (GST) em músculo de quelípedo em $\mu\text{mol/mg proteína.min}$. **D:** Atividade da glutaciona S-transferase (GST) em brânquias em $\mu\text{mol/mg proteína.min}$. **E:** Níveis de TBARS em músculo de quelípedo em $\mu\text{mol/mg proteína}$, representando o dano por lipoperoxidação. **F:** Níveis de TBARS em brânquias em $\mu\text{mol/mg proteína}$

Já foi demonstrado aumento das atividades de enzimas antioxidantes em outros crustáceos em situações de hipóxia, como em *Litopenaeus vannamei* (Parrilla-Taylor & Zenteno-Savín, 2011), *Neohelice granulata* (Oliveira *et al.*, 2005), *Niphargus rhenorhodanensis* (Lawniczak *et al.*, 2013) e *Parastacus brasiliensis promatensis* (Pinheiro & Oliveira, 2016B). Também, Fanjul-Moles *et al.* (2003) e Pinheiro e Oliveira (2016B) mostraram que há um efeito do fotoperíodo na atividade dessas enzimas.

Para o epitélio branquial os níveis de TBARS observados não diferiram entre os morfotipos, mas diminuíram no inverno nas brânquias de fêmeas ($p < 0,01$) e machos 2 ($p < 0,01$) (Fig. 6E e F). Esta diminuição dos níveis de TBARS nas brânquias no inverno pode estar associada ao aumento das defesas enzimáticas (SOD e GST) e manutenção de altos níveis de ácido úrico circulante (Fig. 3C) nesse período. Esta não diferença significativa entre os morfotipos (fêmeas, machos 1 e 2) também foi observada no músculo do quelípodo, e apesar de também verificarmos níveis menores de TBARS nos meses de inverno, não houve variação estacional significativa. Este padrão de resposta pode refletir o fato de este tecido estar em menor contato com o ambiente e ser um tecido sujeito a metabolismo anaeróbio podendo assim, ter um sistema antioxidante mais efetivo. Hill *et al.* (2008) afirmam que, no músculo, o ATP é produzido por três mecanismos principais: pela transferência do fosfato de alta energia da creatina para o ADP; pela glicólise e pela fosforilação oxidativa. Cabe ressaltar também que outras enzimas do sistema antioxidante não foram determinadas (p.ex. catalase, peroxirredoxinas, glutathiona redutase e glutathiona peroxidase) assim como, as defesas não enzimáticas teciduais (p.ex. glutathiona, ácido úrico, melatonina e outras moléculas de baixo peso molecular).

O comportamento escavador da espécie em estudo parece ser um importante fator que levou essa espécie a desenvolver mecanismos para resistir a variações em parâmetros ambientais, como por exemplo, à hipóxia. Isto também é observado em outros crustáceos de águas profundas e escavadores como em *Niphargus rhenorhodanensis* (Hervant *et al.*, 1995; Lawniczak *et al.*, 2013), *Niphargus virei* (Hervant *et al.*, 1996), *Parastacus defossus* (Silva-Castiglioni *et al.*, 2010, 2011).

Cabe também ressaltar a capacidade rápida de crescimento, de amadurecimento rápido do sistema reprodutivo e o elevado número de prole desta espécie (Loureiro *et al.*, 2015A). O alto grau dos níveis circulantes de lactato e glicose, da concentração de glicogênio nos tecidos, evidenciados pelos resultados deste trabalho e daquele desenvolvido por Valgas *et al.* (2016), além de níveis elevados de atividade das enzimas antioxidantes e capacidade de síntese de ácido úrico, uma molécula antioxidante, podemos assim supor que esta espécie tem uma alta plasticidade fisiológica frente a diferentes desafios ambientais e assim, pode tornar-se um invasor altamente competente no ambiente límnico de nosso país. Estudos futuros ampliando o conhecimento da capacidade fisiológica frente a estressores ambientais em situações controladas de laboratório tornam-se necessários.

7. Referências Bibliográficas

1. Almar, M, M.; Díaz-Mayans, J.; Ferrando; M.D.; Nuñez; A.; Romero, F.J. 1988 **Organ distribution of glutathione and some glutathione-related enzymatic activities in *Procambarus clarkii*. Effect of sex, size and nutritional state.** Comparative Biochemistry and Physiology 89B(3): 471-474.

2. Barbieri, G.; Verani, J.R.; Barbieri, M.C.. 1982. **Dinâmica quantitativa da nutrição de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1974), na Reserva do Lobo (Brothas Itirapina/SP). (Pisces, Erythrinidae).** Revista Brasileira de Biologia 42(2): 295-302.
3. Bissattini, A.M.; Traversetti, L.; Bellavia, G.; Scalici, M. 2015. **Tolerance of increasing water salinity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852).** Journal of Crustacean Biology 35(5): 682-685.
4. Bonvillain, C.P.; Rutherford, D.A.; Kelso, W.E.; Green, C.C. 2012. **Physiological biomarkers of hypoxic stress in red swamp crayfish *Procambarus clarkii* from field and laboratory experiments.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 163: 15-21.
5. Bonvillain, C.P.; Rutherford, D.A.; Kelso, W.E. 2015. **Effects of environmental hypoxia on population characteristics of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in the Atchafalaya River Basin, Louisiana.** Hydrobiologia 743: 309-310.
6. Boveris, A.; Cadenas, E. 1982. **Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria.** In: Oberley, L.W. (Ed.), vol.2. Superoxide dismutase, Boca Raton, FL p15–30.
7. Boyland, E.; Chasseaud, L.F. 1969. **The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis.** Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 32: 173–219.
8. Braghirolli, F.M.; Oliveira, M.R.; Oliveira, G.T. 2016. **Seasonal variability of metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyaella kaingang* (Crustacea, Amphipoda).** Ecotoxicology and Environmental Safety 130: 177-184.

9. Buege, J.A.; Aust, S.D. 1978. **Microsomal lipids peroxidation**. Methods in Enzymology 52: 301–310.
10. Bunch, A.J.; Allen, M.S.; Gwinn, D.C.; 2010. **Spatial and temporal hypoxia dynamics in dense emergent macrophytes in a Florida lake**. Wetlands 30: 429–435.
11. Childress, J.J.; Seibel, B.A. 1998. **Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers**. Journal of Experimental Biology 201: 1223-1232.
12. Chucholl, C. 2016. **The bad and the super-bad: prioritizing the threat of six invasive alien to three imperilled native crayfishes**. Biological Invasions 18(7): 1967-1988.
13. Correia, A.M.; Ferreira, O. 1995. **Burrowing behavior of the introduced red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Portugal**. Journal of Crustacean Biology 15(2): 248-257.
14. Cronin, G. 1998. **Influence of macrophyte structure, nutritive value, and chemistry on the feeding choices of a generalist crayfish**. In Jeppesen, E.; Søndergaard, M.; Søndergaard, M.; Christoffersen, K. (eds). The Structuring Role of Submerged Macrophytes in Lakes. Springer, NewYork: 307–317.
15. Ellington, W.R. 1983. **The recovery from anaerobic metabolism in invertebrates**. The Journal of Experimental Zoology 228: 431-444.
16. Fanjul-Moles, M.L.; Bosques-Tistler, T.; Prieto-Sagredo, J.; Castañon-Cervantes, O.; Rivera-Río; L.F. 1998. **Effect of variation in photoperiod and light intensity on oxygen consumption, lactate concentration and behavior in crayfish *Procambarus clarkii* and *Procambarus digueti***. Comparative Biochemistry and Physiology 119A(1): 263-269.

17. Fanjul-Moles, M.L.; Durán-Lizarraga, M.E.; Gonsenbatt, M.E.; Prieto-Sagredo, J. 2003. **The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circa-dian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*.** *Photochemistry and Photobiology* 77: 210–218.
18. Gherardi, F.; Raddi, A.; Barbaresi, S.; Salvi, G. 2000. **Life history patterns of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in an irrigation ditch in Tuscany, Italy.** *Crustacean Issues* 12: 9–108.
19. Hervant F.; Mathieu, J.; Garin, D.; Fréminet, A. 1995. **Behavioral, ventilatory and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and the epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda).** *Physiological Zoology* 68: 223-244.
20. Hervant, F.; Mathieu, J.; Garin, D.; Fréminet, A. 1996. **Behavioral, ventilator and metabolic responses of the hypogean amphipod *Niphargus virei* and the epigean isopod *Asellus aquaticus* to severe hypoxia and subsequent recovery.** *Physiological Zoology* 69: 1277–1300.
21. Hill, R.W.; Wyse, G.A.; Anderson, M. 2008. **Animal Physiology.** Sinauer Associates, Inc. (2ed), 770p.
22. Hochachka, P.W.; Somero, G.N.; Schneider, D.E.; Freed, J.M. 1970. **The organization and control of metabolism in the crustacean gill.** *Comparative Biochemistry and Physiology* 33: 529-548.
23. Hochachka, P.W.; Somero, G.N. 2002. **Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution.** New York, Oxford University Press, 425p.

24. Huner J.V, Lindqvist O.V. 1995. **Physiological adaptations of freshwater crayfish that permit successful aquacultural enterprises.** American Zoologist 35: 12-19.
25. Jewell, C.S.; Lee, R.F.; Winston, G.W. **Purification and properties of hepato-pancreas and green gland cytosolic glutathione S-Transferases of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*.** Marine Environmental Research 28: 81-85.
26. Kucharski, L.C.R.; da Silva, R.S.M. 1991 **Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851).** Comparative Biochemistry and Physiology 100A(3): 599-602.
27. Laufer, H.; Demir, N.; Pan, X.; Stuart, J.D.; Ahl; J.S.B. 2005. **Methyl farnesoate controls adult male morphogenesis in the crayfish, *Procambarus clarkii*.** Journal of Insect Physiology 51: 379-384.
28. Lawniczak, M.; Romestaing, C.; Roussel, D.; Maazouzi, C.; Renault, D.; Hervant, F. 2013. **Preventive antioxidant responses to extreme oxygen level fluctuation in a subterranean crustacean.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 165: 299-303.
29. Loureiro, T. G.; Anastácio, P.M.S.G.; Araujo P.B.; Souty-Grosset, C.; Almerão, M. P. 2015A. **Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion – an overview.** Nauplius 23 (1): 1-10.
30. Loureiro, T. G.; Anastácio, P.M.S.G.; Bueno, L. S .S. ;Araujo P.B.; Souty-Grosset, C.; Almerão, M. P. 2015B. **Distribution, introduction pathway, and invasion risk analysis of the north american crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in southeast Brazil.** Journal of Crustacean Biology. 35 (1): 88-96.

31. Magalhães, C.; Bueno, S.L.S.; Bond-Buckup, G.; Valenti, W.C.; da Silva, H.L.M.; Kiyohara, F.; Mossolin, E.C.; Rocha, S.S. 2005. **Exotic species of freshwater decapod crustaceans in the state of Sao Paulo, Brazil: records and possible causes of their introduction.** *Biodiversity and Conservation* 14: 1929-1945.
32. Mauro, N.A.; Thompson, C. 1984. **Hypoxia adaptation in the crayfish *Procambarus clarkii*.** *Comparative Biochemistry and Physiology* 79A(1): 73-75.
33. McMahon, B.R.; Stuart, S.A., 1999. **Haemolymph gas exchange and ionic and acid–base regulation during long-term air exposure and aquatic recovery in *Procambarus clarkii*.** *Freshwater Crayfish* 12: 134–153.
34. McMahon, B.R.; Wilkes, P.R.H. 1983. **Emergence responses and aerial ventilation in normoxic and hypoxic crayfish *Orconectes rusticus*.** *Physiological Zoology* 56: 133–141.
35. Meng, Q.; Chen, J.; Xu, C.; Huang, Y.; Wang, Y.; Wang, T.; Zhai, X.; Gu, W.; Wang, W. 2013 **The characterization, expression and activity analysis of superoxide dismutases (SODs) from *Procambarus clarkii*.** *Aquaculture*, 406-407: 131-140.
36. Miranda, L.E.; Driscoll, M.P.; Allen, M.S. 2000. **Transient physicochemical microhabitats facilitate fish survival in inhospitable aquatic plant stands.** *Freshwater Biology* 44: 617–628.
37. Morris, S.; Bridges, C.R.; Grieshaber M.K. 1985. **A new role for uric acid: modulator of haemocyanin oxygen affinity in crustaceans.** *The Journal of Experimental Zoology* 235: 135-139.

38. Morris, S.; Callaghan, J. 1998. **Respiratory and metabolic responses of the Australian Yabby *Cherax destructor* to progressive and sustained environmental hypoxia.** Journal of Comparative Physiology B 168: 377-388.
39. Moyes, C.D.; Schulte, P.M. 2008. **Principles of Animal Physiology.** Pearson/Benjamin Cummings (2ed), 754p.
40. Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J. 2003. **Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent.** Aquatic Toxicology 63: 447–463.
41. Oliveira G.T.; da Silva. R.S.M. 1997. **Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 118(4): 1429-1435.
42. Oliveira, G. T.; Rossi, I.; da Silva. R.S.M. 2001. **Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets.** Marine Biology 139(2): 335-342.
43. Oliveira, G. T.; Rossi, I.; da Silva. R.S.M.; Eichler, P. 2004. **Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets.** The Journal of Experimental Zoology 301: 240-248
44. Oliveira, U.O.; Araújo, A.S.R.; Belló-Klein, A.; Silva, R.S.M.; Kucharski; L.C. 2005. **Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 140: 51-57.

45. 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.
46. Parrilla-Taylor, D.P.; Zenteno-Savín, T. 2011. **Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation.** Aquaculture 318: 379-383
47. Peiró, D.F.; Almerão, M.P.; Delaunay, C.; Jussila, J.; Makkonen, J.; Bouchon, D.; Araujo, P.B.; Souty-Grosset, C. 2016. **First detection of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in South America: a high potential risk to native crayfish.** Hydrobiologia 781:181-190.
48. Pinheiro, L.C.; Oliveira, G.T. 2016A. **Oxidative status profile in different tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a seasonal cycle.** Journal of Experimental Zoology 325A(5): 318-328.
49. Pinheiro, L.C.; Oliveira, G.T. 2016B. **Seasonal variation in metabolic parameters and body condition indices in male and female of the crayfish *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda).** Marine and Fresh Water Behavior and Physiology. Submetido.
50. Powell, M.L., Watts, S.A. 2010. **Response to long-term nutrient deprivation and recovery in the crayfishes *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus* (Crustacea, Decapoda): component and proximate analyses.** Journal of the World Aquaculture Society 41: 71–80.
51. Rodríguez, C.F.; Bécares, E.; Fernández-Aláez, M. 2003. **Shift from clear to turbid phase in Lake Chozas (NW Spain) due to the introduction of**

- American red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Hydrobiologia*, 506: 421-26.
52. Rodríguez-Pérez, H.; Hilaire, S.; Mesléard, F. 2016. **Temporary pond ecosystem functioning shifts mediated by the exotic red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*): a mesocosm study.** *Hydrobiologia* 767: 333-345.
53. Sahib, I.K.A.; Rao, K.R.S.; Rao, K.V. 1984. **Effect of malathion on protein syntethic potentiality of the tissues of the teleost, *Tilapia mossambica* (Peters), as measured throught incorporation of ¹⁴C amino acids.** *Toxicology Letters* 20: 63-67.
54. 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, Part A* 148: 204-213.
55. Silva-Castiglioni, D.; Oliveira, G.T.; Buckup, L. 2010. **Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 156: 436-444.
56. Silva-Castiglioni, D.; Oliveira, G.T.; Buckup, L. 2011. **Metabolic responses in two species of crayfish (*Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis*) to post-hypoxia recovery.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 159: 332-338.
57. Silva-Castiglioni, D.; Dutra, B.K.; Oliveira, G.T.; Buckup, L. 2012 **Comparison of the seasonal variation of the biochemical composition in two species of freshwater crayfish from southern Brazil.** *Animal Biology* 62: 53-82.

58. Silva-Castiglioni, D.; Valgas, A.A.N.; Machado, I.D.; Freitas, B.S.; Oliveira, G.T. 2015. **Effect of different starvation and refeeding periods on macromolecules in the haemolymph, digestive parameters, and reproductive state in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda, Aeglidae).** Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 49(1): 27-45
59. Souty-Grosset, C.; Reynolds, J.; Gherardi, F.; Aquiloni, L.; Coignet, A.; Pinet, F.; Cisneros, M.M.M. 2014. **Burrowing activity of the invasive red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, in fishponds of La Brenne (France).** Ethology Ecology and Evolution 26(2-3): 263-276.
60. Storey, K.B.; Storey, J.M. 2004. **Oxygen limitation and metabolic rate depression.** In: Storey, K.B.(Ed.), Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. Wiley-Liss, Hoboken, NJ. 594pp.
61. Valgas, A.A.N.; Wingen, N.; Rückheim, L.P.; Araujo, P.B.; Oliveira, G.T. **Estabelecimento de Marcadores Fisiológicos para o Lagostim Invasor: *Procambarus clarkii* Girard, 1852 (Decapoda, Cambaridae).** IX Congresso Brasileiro sobre Crustáceos, realizado de 6 a 9 de novembro de 2016, no Centro de Convenções do Cariri, cidade do Crato-CE, Brasil.
62. Van Handel, E. 1965. **Estimation of glycogen in small amount soft tissue.** Analytical Biochemistry 11: 256-265.
63. Vernberg, F.J. 1983. **Respiratory Adaptations,** In: Bliss, D.E. (Ed.). Vol. 8, **Biology of Crustacea.** Academic Press, New York.
64. Veselý, L.; Buřič, M.; Kouba, A. 2015. **Hardy exotics species in temperate zone: can “warm water” crayfish invaders establish regardless of low temperatures?** Scientific Reports 5, 16340; doi: 10.1038/srep16340.