

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

EFEITO DA INSULINA SOBRE A ATIVIDADE DA ENZIMA $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPASE
BRANQUIAL, A SÍNTESE DE PROTEÍNAS E CAPTAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO
HEPATOPÂNCREAS, MÚSCULO E BRÂNQUIAS DE *Chasmagnathus granulata*
(DANA, 1851)

HUMBERTO MACHADO MARTINS

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas: ênfase Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre

Abril, 2003

*A minha esposa e a minha filha,
com amor e gratidão.*

*A meus pais, meu irmão e minha sogra,
com carinho.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva, pela coragem, pelo exemplo de pesquisadora, pela orientação dedicada e paciente e pela amizade e carinho.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski, meu especial reconhecimento pelo inestimável apoio e amizade, pela paciência, companheirismo e bom humor.

Às colegas Alessandra, Ana Lúcia, Fabíola, Gabriela, Márcia, Paula e Vanessa, pelos preciosos ensinamentos, pelo auxílio na execução dos experimentos e pela inesquecível convivência.

Ao Rafael Panke, pela amizade e inestimável auxílio na execução dos experimentos.

Aos colegas Glauco, Guilherme, Luciano, Matheus, Rafael, Rodrigo, Ubirajara e Yann pela amizade, companheirismo e apoio.

À técnica e amiga Maria Alice pelo carinho, pela torcida e preciosa manutenção do material necessário à execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Ivo Homem Bitencourt Jr. pelo apoio logístico.

À Rita pelos doces e salgados que “salvaram a pátria” em longos dias de experimento.

À Srta. Uiraçara Vilarinho pela amizade e apoio.

A Elsa pelo carinho e alegria.

Às Sras. Maria Leonor Goulart, Guilma Arezzo e Lizete Lunardi, pela acolhida, amizade, carinho e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Cristina e Paulo Heuser e Christiane Lopes pelo apoio, amizade e carinho.

A minha esposa e minha filha, pelo amor, apoio, compreensão e estímulo ao longo dos anos.

Aos meus pais, pela oportunidade de acesso à formação acadêmica e liberdade de escolha.

À Laura Maria pelo constante incentivo para seguir novos caminhos.

À Prof. Iara Brasileiro e à Sra. Eurídice C. S. Ferro, da Universidade de Brasília, pela cooperação na obtenção de *papers*.

Ao Sr. José Gómez, pelo incentivo e amizade incondicional.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia da UFRGS pela convivência, ensinamentos e amizade.

À Universidade Católica de Brasília - UCB pelo suporte financeiro.

Ao *Chasmagnathus granulata* desconhecido, integrante principal deste trabalho, meu agradecimento especial.

INTRODUÇÃO

A ocupação de diferentes habitats exigiu das espécies animais o desenvolvimento de estratégias de preservação da água corporal (PEQUEUX, 1995). Os biótopos aquáticos, como água salobra, estuários e ambiente entre-marés, onde ocorrem grandes variações de salinidade, são um desafio constante para as espécies que neles habitam, exigindo das mesmas mecanismos fisiológicos aptos à regulação osmótica dos fluidos corporais. Os crustáceos que ocupam vários habitats, incluindo o ambiente marinho, estuarino e terrestre, se adaptaram à ampla variabilidade química e física desses meios, diversificando a capacidade osmorreguladora de seus fluidos corporais (ROBERTSON, 1960; PROSSER, 1973). Isso determinou nos crustáceos o estabelecimento de dois tipos de resposta, espécies que toleram uma estreita variação de salinidade - estonoalinas - e aquelas que resistem a uma ampla variação de salinidade - eurialinas (PEQUEUX, 1995).

A distribuição dos crustáceos aquáticos na natureza depende essencialmente de dois mecanismos de regulação osmótica e iônica: a Regulação Anisosmótica Extracelular (RAE) e a Regulação Isosmótica Intracelular (RII). A primeira controla a osmolalidade, composição e volume do fluido extracelular, através de alterações na permeabilidade do corpo e do transporte de íons, mecanismos intermediados pela atividade das enzimas Na^+ - K^+ -ATPase e anidrase carbônica, enquanto que a RII está relacionada com a manutenção do volume e composição do fluido intracelular (GILLES & DELPIRE, 1997). De acordo com a capacidade de regular os fluidos corporais os crustáceos podem ser osmoconformadores (não regulam a osmolalidade de seus fluidos, conformando-se à osmolalidade do meio) ou

osmorreguladores (mantém a sua osmolalidade interna razoavelmente constante, independentemente do meio em que estão imersos) (GILLES & DELPIRE, 1997).

A restauração e a manutenção do volume celular e do padrão intracelular de solutos compatíveis com as diferentes funções celulares são problemas que as espécies animais têm que enfrentar frente a ampla diversidade dos meios que circundam as células. Este meio externo, na maioria das vezes, é um fluido extracelular ou a própria hemolinfa. É caracterizado por uma quantidade de solutos cuja concentração é sempre muito diferente do fluido intracelular. Tal situação gera um gradiente de potencial que favorece o transporte de solutos através da membrana que é semipermeável.

Como outras espécies animais, os crustáceos desenvolveram mecanismos moleculares básicos para assegurar um balanço de água e solutos intracelulares adequado as variações impostas pelos diferentes habitats.

A manutenção do fluido intracelular isosmótico ao extracelular ou ao meio externo, é uma das formas de regulação osmótica; a outra seria a manutenção da concentração osmótica dos fluidos extracelulares relativamente constante, independente da salinidade do meio circundante, objetivando o controle da osmose celular. A osmolalidade do fluido extracelular dos crustáceos é principalmente devido aos íons inorgânicos, Na^+ e Cl^- . O controle da osmolalidade envolve mecanismos básicos como bombas transportadoras de íons e canais para difusão de íons, encontrados em vários tecidos, como os da parede do corpo, do trato gastrintestinal e dos órgãos excretores, com função transporte de Na^+ e Cl^- . Tudo leva a crer que o epitélio branquial possa ser a mais importante estrutura na

manutenção do balanço Na^+/Cl^- hemolinfático em crustáceos, por apresentar mecanismo de transporte ativo de íons (MANTEL, 1968; TOWLE, 1981; PEQUEUX, 1995; MCNAMARA & TORRES, 1999).

De acordo com AUGUSTO (2000), os tecidos epiteliais são especializados, com polarização anatômica e funcional. A sua superfície apical faceia o meio externo, enquanto a superfície basal faceia o meio interno contendo o fluido extracelular. As células especializadas no transporte iônico ativo são caracterizadas, principalmente, por microvilos apicais e invaginações basais associadas à numerosas mitocôndrias, as quais estão relacionadas ao fornecimento de ATP para a atividade enzimática das bombas. Ainda, segundo AUGUSTO (2000), os mecanismos de Regulação Anisomótica Extracelular (ERA) são intermediados pela atividade das enzimas Na^+-K^+ -ATPase e anidrase carbônica. A primeira, localizada na membrana basolateral das células do epitélio branquial, é responsável pelo transporte ativo de sódio da célula para a hemolinfa, enquanto que a segunda hidrata o CO_2 para formar H^+ e HCO_3^- , componentes do mecanismo de captação de NA^+ .

Em algumas espécies dos caranguejos como no *Cardisoma guanhumi* (QUINN & LOORE, 1986), *Birgus latro*, *Gecarcoidea lalandii*, *Cardisoma carnifex* (TOWLE, 1981), a atividade da Na^+-K^+ -ATPase é maior nas brânquias do que em outros órgãos, chegando a atingir 80% da atividade ATPase total em *Carcinus maenas* (SIEBERS e cols., 1985).

Através da utilização da técnica de coloração com prata, foi observado um aumento significativo no número de sítios transportadores de sal em brânquias de crustáceos reguladores hiperosmóticos, após a aclimação a um meio diluído (COPELAND & FITZJARREL, 1968). A aclimação da espécie *F. heteroclitus* a meios de alta e baixa salinidade, provoca mudanças no número de células de cloreto e na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (KARNAKY e cols., 1976), mudanças adaptativas semelhantes foram observadas em brânquias do caranguejo azul, *Callinectes sapidus* (TOWEL & KAYS, 1986). Nesta espécie as células de cloreto estão localizadas nas brânquias posteriores (COPELAND & FITZJARREL, 1968). Em outras espécies de caranguejos osmorreguladores, a atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ também é observada nas membranas celulares basolaterais do epitélio branquial (TOWLE & KAYS, 1986), particularmente em brânquias posteriores, que apresentam sítios ou áreas com ionócitos especializados (COPELAND, 1964; BARRA & HUMBERT, 1983). Aumento no número desses sítios é observado em animais aclimatados à baixa salinidade (COPELAND & FITZJARREL, 1968; NEUFELD e cols., 1980; ALDRIGE & CAMERON, 1982). Em *Artemia salina*, camarão “brine” (CROGHAN, 1958), e no isópoda intertidal *Idotea woesneslinskii* (HOLLIDAY, 1988), os sítios, onde estão localizados os ionócitos na estrutura branquial, são responsáveis pelo transporte de íons durante o processo de osmorregulação nestes caranguejos.

A maioria das espécies de caranguejos que são eurialinas é hiperosmorreguladora a baixa salinidade, bombeando íons ativamente da água de salinidade baixa para a hemolinfa (MANTEL & FARMER, 1983; LUCU, 1990), sendo os maiores sítios de transporte de íons as brânquias posteriores 6 e 7. Estas brânquias apresentam um número maior de células bombeadoras de íons ricas em mitocôndrias e maior atividade das enzimas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

e anidrase carbônica, quando comparadas com outras brânquias posteriores e principalmente com as anteriores (NEUFELD e cols., 1980; PEQUEUX e cols., 1984; LUCU, 1990)

Segundo NEUFELD e cols. (1980) os pares 6 e 7 das brânquias posteriores mostram, em resposta a aclimação à baixa salinidade, um aumento maior de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ do que o par 8. No entanto, os pares anteriores 4 e 5 não apresentam um aumento significativo da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas mesmas condições. Contudo, outros pesquisadores (TOWEL & KAYS, 1986; HENRY & CAMERON, 1982; SAVAGE & ROBINSON, 1983; HENRY, 1988a) admitem haver um aumento de atividade da anidrase carbônica e da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias anteriores de caranguejos expostos à baixa salinidade. Em caranguejos que foram caracterizados como hiperosmorreguladores, *Cardisoma guanhumi*, *Callinectes sapidus*, *Ceracinus lateralis*, *Carcinus maenas* e *Eriocheir sinensis*, a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias é considerada alta (QUIN & LANE, 1966; MANTEL & OLSON, 1976; TOWLE & KAYS, 1986; MANTEL & LANDESMAN, 1977; PEQUEUX & GILLES, 1977). No entanto, em caranguejos que mostram baixa capacidade osmorreguladora, como *Libinia emarginata* e *Carnei irroratus*, a atividade é menor (MANTEL & LANDESMAN, 1977; NEUFELD & PRITCHARD, 1979).

Em cinco espécies de caranguejos, *Calappa hepatica* (osmoconformador), *Panopeus herbstii* (bom osmorregulador), *Thalamita crenata* (bom osmorregulador), *Metopograpsus thukihor* e *Cyclograpsus henshawi* (semi-terrestres e excelentes osmorreguladores), foram observadas diferentes alterações na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ branquial, em resposta a aclimação à diferentes salinidades (SPENCER e cols., 1979).

Experimentos mostram que a atividade dessa enzima nas brânquias não aumenta quando certas espécies de caranguejos são submetidas a um meio diluído e que há uma relação entre a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ e o grau de hiporregulação osmótica desses animais em 100% de água do mar (SPENCER e cols., 1979). O mesmo foi observado com o caranguejo vermelho *Pseudosesarma moeschi* que hiporregula a 100% da água do mar, mostrando-se um forte osmorregulador num amplo intervalo de salinidade externa: hiperregula em 5%, 10% e 25% da água do mar, fica próximo do ponto isosmótico em 50% e 75% (COROTTO & HOLLIDAY, 1996). O caranguejo púrpura de entre-marés, *Hemigrapsus nudus* é um forte hiperosmorregulador em 25%, 50% e 75% de água do mar, mas no entanto, diferentemente do anterior é isosmótico a 100% de água do mar (COROTTO & HOLLIDAY, 1996).

A $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ assume um papel importante na regulação da concentração intracelular dos íons K^+ e Na^+ , através do controle do movimento desses íons entre a hemolinfa e o fluido intracelular (PEQUEUX, 1995). Esta enzima é uma P-ATPase ligada à membrana e composta de pelo menos 3 subunidades α , β e γ (BLANCO & MERCER, 1998). Ela está envolvida na manutenção do volume celular e dos gradientes eletroquímicos de Na^+ e K^+ e, portanto, no potencial de membrana gerado pela permeabilidade diferenciada da membrana a esses dois íons. Essa enzima também participa do transporte de glicose e aminoácidos acoplado ao Na^+ , controle do pH e balanço osmótico e portanto do volume celular (SWEENEY & KLIP, 1998).

A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ que constitui uma unidade funcional capaz de hidrolisar o ATP, é composta de uma subunidade α de 112 KDa, uma β de 35 KDa, e a nem sempre presente subunidade γ (THERIEN & BLOSTEIN, 2000), presente na membrana plasmática geralmente como um heterodímero $\alpha\text{-}\beta$. Tem sido relatado a ocorrência de reservatórios intracelulares dessa bomba e excessos de subunidades α e β intracelularmente. A subunidade α , que contém sítios de ligação para Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , ATP e para o glicosídeo cardíaco ouabaína, é responsável pela atividade catalítica da enzima (SWEENEY & KLIP, 1998). Como produto de diferentes genes, foram identificadas quatro isoformas para a subunidade α com variação na ocorrência da expressão desta subunidade entre os tecidos. A isoforma α_1 tem distribuição ubíqua, a α_2 é predominante em músculo de adultos, enquanto que o cérebro de rato expressa todas as isoformas (SWEENEY & KLIP, 1998). As isoformas diferem em sua afinidade pelo Na^+ intracelular ($\alpha_1=\alpha_2>\alpha_3$) e para o K^+ extracelular ($\alpha_3>\alpha_1=\alpha_2$). Outra diferença funcional observada entre as isoformas da subunidade α de roedores é sua sensibilidade à inibição pela ouabaína, a isoforma α_1 exibe uma baixa afinidade por esse glicosídeo cardíaco, enquanto que a α_2 e α_3 mostram alta afinidade. Em primatas, no entanto, não foi observada uma diferença marcante entre as isoformas da subunidade α (SWEENEY & KLIP, 1998). Foram identificadas pelo menos três isoformas para a subunidade β em células de mamíferos (LEVENSON, 1994; MALIK e cols., 1996). A subunidade β parece participar no ancoramento do complexo na membrana plasmática (THERIEN & BLOSTEIN, 2000), na regulação da liberação das subunidades α de estoques intracelulares para a membrana plasmática (McDONOUGH e cols., 1990), determinar sua polarização (SCHMALZING e cols., 1991) e de alguma maneira contribuir para a ligação e transporte de K^+ (GEERING e cols., 1996). A

subunidade γ , quando presente, parece ter um papel regulatório na enzima (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

Para FAMBROUGH e cols. (1994) a existência de múltiplas isoformas para as subunidades α e β , sugere que a associação preferencial de subunidades diferentes deve regular as propriedades funcionais da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (EAKLE e cols., 1995; HUNDAL e cols., 1992).

Baseado em estudos em lagostim, McWHINNIE (1962) sugeriu, pela primeira vez, um provável controle neuro-endócrino da homeostase hidromineral em crustáceos. Um elemento de grande importância no mecanismo dessa homeostase é o controle da regulação iônica e dos mecanismos de trocas branquiais. A regulação iônica e a regulação da atividade dos mecanismos de troca branquiais está sob o controle neuroendócrino, sendo o órgão pericárdico (OP), provavelmente, a principal estrutura envolvida nesta regulação através da ação da dopamina, 5-hidroxitriptamina, octopamina, monoaminas liberadas na hemolinfa pelos axônios neurosecretores adjacentes ao coração (órgão pericárdico) (KAMEMOTO, 1982; KAMEMOTO & OYAMA, 1985; LOHRMAN & KAMEMOTO, 1987). Também a proctolina (STANGIER e cols., 1986) e o peptídeo cardioativo (STANGIER e cols., 1987), hormônios peptídicos, estariam envolvidos nessa regulação neuroendócrina. A administração de extratos de OP, oriundos de *C. sapidus* aclimatados a um meio de baixa salinidade, e dopamina em caranguejos mantidos em água do mar aumentou significativamente a atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ nas brânquias (SAVAGE & ROBSON, 1983; SOMMER & MANTEL, 1988). Os resultados de vários trabalhos

mostram que a enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ deve ser controlada pelo sistema Dopamina/cAMP, promovendo um aumento na captação de Na^+ quando a concentração de cAMP está aumentada, atuando como um segundo mensageiro (LOHRMANN & KAMEMOTO, 1987; SOMMER & MANTEL, 1988; 1991).

TRAUSCH e cols. (1989) demonstraram que aminas biogênicas como a dopamina e serotonina, estimulavam a fosforilação das proteínas na fração que continha atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ somente na presença de frações solúveis que continham proteína quinase dependente de cAMP. O envolvimento do cAMP e da proteína quinase no transporte de Na^+Cl^- foi demonstrado por BIANCHINI & GILLES (1990). Os fatores neuroendócrinos que estimulam a fosforilação mediada pelo cAMP através da proteína quinase, devem promover uma rápida modulação ou um rápido ajuste da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (SOMMER & MANTEL, 1988; TRAUSCH e cols., 1989), o mesmo observado em tecidos osmorreguladores de teleósteos marinhos, em resposta à variações de salinidade (TIPSMARK & MADSEN, 2000).

Existindo uma regulação a curto prazo desta enzima, seria razoável acreditar na existência de uma regulação a longo prazo, talvez em resposta à variação de salinidade do meio, intermediada pela ação de um ou mais hormônios. TIPSMARK & MADSEN (2000) propõem uma regulação mais lenta da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, em tecidos osmorreguladores de teleósteos, em resposta à variações de salinidade do meio. Esta regulação abrangeria um período de 3 a 7 dias, envolvendo a participação de vários

hormônios na modulação do gene e expressão protéica da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, ou seja a síntese de nova enzima no curso de uma aclimatação de longo termo.

Mudanças fisiológicas e bioquímicas observadas em brânquias, intestino e rins, durante a “*parr-smolt transformation*” em salmonídeos, resultam em um aumento de tolerância à salinidade, com um aumento na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ branquial (McCORMICK & SAUNDERS, 1987; HOAR, 1988).

Tem sido observado que os hormônios de crescimento (GH) e cortisol estão diretamente relacionados com o controle da habilidade hiposmorregulatória durante a “*parr-smolt transformation*” em salmonídeos. Espécimes de salmão do Atlântico, *Salmo salar*, quando submetidos à administração de GH exógeno (BOEUF e cols., 1990) e cortisol (BISBAL & SPENCER, 1991), apresentam um aumento na atividade de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias acompanhada de uma maior tolerância à salinidade do meio. Os resultados obtidos por McCORMICK (1995) demonstram uma interação entre o fator de crescimento I (IGF-I) e o cortisol na regulação da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias do salmão do Atlântico *Salmo salar*. Contudo, o tratamento com GH e cortisol juntos teve um efeito menor do que o esperado.

A administração de 0,01 ou 0,1 μg de IGF-I recombinante humano (rhIGF-I) por g. de peso corporal na truta marrom *Salmo trutta*, aumentou a densidade celular de imunoreatividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (células NKIR) nos filamentos primários branquiais em animais previamente aclimatados à água doce e transferidos para a água do mar. Esse efeito foi associado com um aumento no nível de $\alpha\text{-mRNA}$ (SEIDELIN & MADSEN, 1999).

Dois mecanismos estão envolvidos na regulação da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, um de curto prazo e outro de longo prazo, no primeiro, rápidas mudanças na atividade da bomba podem ocorrer ou por variações nas concentrações dos substratos ou por mudanças nas propriedades cinéticas da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, resultantes de alterações celulares devido a uma cascata de sinais em resposta a ligação de um hormônio ao seu receptor. Os eventos dessa cascata de sinais seriam a ativação da proteína quinase A pelo cAMP, ativação da proteína quinase C pelo diacilglicerol e ativação da calmodulina quinase pela concentração de cálcio livre intracelular, que fosforilam enzimas, inclusive a própria $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. A regulação de curto prazo da bomba deve envolver as seguintes alterações: 1- seu "turnover"; 2- sua afinidade por substratos; 3- sua abundância na superfície celular através da translocação de unidades pré-formadas à partir de compartimentos estoques intracelulares. (EWART & KLIP, 1995)

As mudanças de longo prazo na regulação desta enzima em resposta à presença constante de hormônios são: alterações na transcrição de genes, assim como na meia vida do mRNA (EWART & KLIP, 1995; McDONOUGH, GEERING & FARLEY, 1990; GEERING, 1990).

A aldosterona, os hormônios tireoidianos, as catecolaminas e a insulina são os principais hormônios que atuam na regulação da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. A insulina além de ser o principal hormônio que regula o metabolismo dos carboidratos, assume um papel fundamental na homeostase do Na^+ e do K^+ . Em 1924 BRIGGS e cols. constataram com um dos efeitos da insulina um decréscimo na concentração de K^+ extracelular. Mais recentemente, evidências do papel desse hormônio na regulação das correntes de Na^+ , K^+ e

Ca^{2+} foram verificadas por ZIERLER & WU (1988). Outras ações da insulina sobre a regulação da $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase seriam: aumentar a sensibilidade ao $[\text{Na}^+]_i$ em adipócitos de ratos (LYTTON cols., 1985; MCGILL & GUIDOTTI, 1992), translocação de subunidades da bomba para a membrana plasmática em fibras musculares de ratos e transcrição gênica (HUNDAL e cols., 1994).

Os hormônios pertencentes a super-família da insulina têm uma ampla distribuição filogenética, pois são encontrados tanto em invertebrados como em vertebrados.

Os estudos comparativos realizados dos agnatas aos mamíferos, mostraram que a insulina é uma molécula bastante antiga, e que o hormônio e suas funções sofreram poucas modificações ao longo da evolução. CHAN & STEINER (2000) sugerem que os insulin growth factors (IGFs) e a insulina e as insulin-like de invertebrados possuem um gene ancestral comum que seria do tipo insulina.

Nos vertebrados, a insulina controla as funções anabólicas (síntese de carboidratos, de lipídios e de diversas proteínas), e os IGFs regulam diretamente o crescimento e o desenvolvimento a nível celular (CHAN & STEINER, 2000). Essas moléculas apresentam semelhanças quanto a sua atividade biológica e estruturas primárias e terciárias (CHAN e cols., 1990). Os IGFs também foram identificados e caracterizados nos vertebrados primitivos (CHAN e cols., 1990).

Em invertebrados, diversos trabalhos utilizando técnicas de imunocitoquímica, bioquímica, radioimunoensaio, biologia molecular e química de proteínas demonstraram a

presença de insulina ou substância semelhante à insulina em células neurosecretoras cerebrais e no sistema gastro-entero-pancreático de nematóides, insetos, moluscos, anelídeos e crustáceos (EPPLÉ & BRINN, 1987; CHAN & STEINER, 2000).

Em invertebrados, contudo, somente quatro seqüências de moléculas da super-família da insulina foram até agora caracterizadas, são elas as bombixinas (4K-PTTHs) do *Bombyx mori* (ISHIZAKI & SUZUKI, 1988), o LIRP da *Locusta migratoria* (LANGUEUX e cols., 1990), os MIPs do *Lymnaea stagnalis* (SMIT e cols., 1998) e no nematóide *C. elegans* (DURET e cols., 1998). O alinhamento das seqüências mostrou que as moléculas semelhantes à insulina de invertebrados apresentam pouca homologia entre elas e com as insulinas e IGFs de vertebrados. As zonas mais conservadas estão limitadas a pequenas regiões vizinhas a certos aminoácidos, em particular, aos resíduos de cisteínas. Este fraco grau de conservação das moléculas semelhantes à insulina nos invertebrados, explica as dificuldades de identificação e de purificação dessas moléculas nesses animais, pois as estratégias baseadas na utilização de sondas moleculares imunológicas ou nucléicas mostraram-se, geralmente, ineficazes.

Experimentos realizados nas duas últimas décadas demonstram a presença de receptores para insulina em tecidos-alvo clássicos em todas as classes de vertebrados (HART e cols., 1987; MARQUES e cols., 1984; SHEMER e cols., 1987; SIMON & LEROITH, 1986). KUCHARSKI e cols. (1997) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, a presença de receptores à insulina em brânquias do caranguejo *C. granulata*. Estes receptores apresentam propriedades semelhantes àquelas observadas em receptores de insulina em tecidos-alvo clássicos de vertebrados. KUCHARSKI e cols. (1999) também

demonstraram, pela primeira vez, que os receptores à insulina nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* pertenciam à família tirosina quinase como os receptores de mamíferos. Estes autores sugerem que no *C. granulata* a transdução do sinal da insulina em células branquiais é similar àquele de mamíferos: ligação do hormônio à subunidade α , autofosforilação da subunidade β , fosforilação de proteínas citoplasmáticas.

O habitat estuarino do caranguejo *Chasmagnathus granulata* é caracterizado por flutuações na salinidade, impondo estresse iônico e osmótico aos indivíduos da espécie. Para manter uma alta osmolaridade hemolinfática, os caranguejos hiperreguladores utilizam o transporte iônico ativo nas brânquias, através da ação da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, localizada basolateralmente que é responsável pelo transporte ativo de sódio para a hemolinfa.

Segundo EICHLER (2001), provavelmente as brânquias seriam os órgãos que demandariam maior consumo de energia durante a osmorregulação, para garantir a regulação isosmótica do fluido intracelular e a anisosmótica do fluido extracelular.

Em *C. granulata* foi demonstrada a participação do metabolismo de carboidratos no processo de adaptação ao estresse hiperosmótico, assim como ao hiposmótico, (DA SILVA & KUCHARSKI, 1992; SCHEIN, 1999; OLIVEIRA & DA SILVA, 2000).

O principal monossarídeo na hemolinfa de crustáceos é a glicose (HEREID & FULL, 1988; MORRIS & AIRRIES, 1998). A concentração de glicose hemolinfática mostra flutuações marcantes, conseqüência de vários fatores: estágio da muda, estação do

ano, dieta oferecida, estado alimentar, ciclo circadiano, concentração do hormônio hiperglicemiante, estresse osmótico, anoxia (CHANG & O' CONNOR, 1983; MORRIS & AIRRIESS, 1998; SANTOS & NERY, 1987; OLIVEIRA & DA SILVA, 2000; OLIVEIRA e cols., 2001).

SCHEIN (1999) observou a manutenção dos níveis de glicose na hemolinfa de *C. granulata* aclimatados à dieta ricas em carboidratos ou proteínas, durante o choque hiperosmótico. Contudo, DA SILVA & KUCHARSKI (1992) demonstraram uma diminuição significativa dos valores de glicose hemolinfática durante o processo de adaptação ao estresse hiposmótico em *C. granulata* mantido com a dieta rica em proteínas.

Diversos trabalhos confirmam que os tecidos de crustáceos possuem uma concentração intracelular de aminoácidos livres 10 vezes maior que os tecidos de mamíferos, sendo os principais aminoácidos os gliconeogênicos (alanina, ácido glutâmico, arginina) (GILLES, 1997; GILLES & DELPIRE, 1997).

O papel fisiológico dos aminoácidos não se restringe em fornecer substrato para a via gliconeogênica. Eles contribuem também para a determinação da pressão osmótica intracelular, como efetores osmóticos orgânicos (GILLES, 1997; GILLES & DELPIRE, 1997). Os aminoácidos livres contribuem com aproximadamente 50% da pressão osmótica intracelular, sendo os principais efetores orgânicos osmoticamente ativos em crustáceos (GILLES, 1982; ROBERTSON e cols., 1992; BISHOP & BURTON, 1993). Estudos sobre a composição do conteúdo intracelular de diversas espécies marinhas mostraram que as células estabelecem isosmolaridade com o fluido extra-celular, não através de altos níveis

intracelulares de osmólitos inorgânicos, como sódio, potássio e cloro, mas, principalmente, por meio de altas concentrações de osmólitos orgânicos, como os aminoácidos (GILLES, 1997; GILLES & DELPIRE, 1997).

GILLES (1982), a partir de vários estudos realizados em invertebrados, propôs que durante o ajuste homeostático ocorrem alterações nas concentrações dos aminoácidos livres tissulares, que seriam utilizados em três mecanismos básicos: (1) deslocamento do equilíbrio entre efluxo e influxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; (2) alterações nas taxas de síntese e oxidação desses aminoácidos livres tissulares; (3) "*turnover*" de proteínas. O estresse osmótico em crustáceos e outros invertebrados marinhos leva a uma alteração na concentração dos aminoácidos livres intracelulares, os quais, junto com compostos nitrogenados, como o óxido de trimetilamina e betaína, perfazem 50-60% dos efetores osmóticos nesses animais (GILLES, 1997; GILLES & DELPIRE, 1997).

Vários estudos mostram um aumento na concentração de aminoácidos nos tecidos de invertebrados quando submetidos a estresse hiperosmótico (OKUMA & ABE, 1994; MATSUCHITA & HAYASHI, 1992; BISHOP e cols., 1994; BAGINSKI e PIERCE, 1997; DRAGOTOVICH & PIERCE, 1992), no entanto, durante o choque hiperosmótico, os níveis hemolinfáticos de proteínas e aminoácidos livres diminuem (KOENING, 1981; TAN & CHOONG, 1981; FREIRE e cols., 1995), indicando que as proteínas hemolinfáticas e/ou tissulares possam ser fontes de aminoácidos livres durante esse processo.

Para LYNDON & HOULIHAN (1998), o tecido branquial de peixes e crustáceos é o mais ativo em síntese protéica, seguido pelo fígado, hepatopâncreas, músculo e coração.

Dados obtidos por SCHEIN e cols. (2003) indicam ser a síntese protéica no tecido branquial 100 vezes maior que no hepatopâncreas e músculo.

Em *Tilapia mossambicus* um aumento abrupto da salinidade aumentou a capacidade de síntese protéica mitocondrial (SURESH e cols., 1983). SCHEIN e cols. (2003) verificaram, em animais mantidos a uma dieta rica em proteínas e submetidos ao estresse hiperosmótico, aumento na incorporação de ^{14}C -leucina em proteínas no tecido hepatopancreático, muscular e branquial posterior.

No camarão *Litopenaeus vannamei*, a concentração de proteína hemolinfática está relacionada aos níveis de proteínas da dieta, altos níveis de proteína na dieta aumentam a concentração proteica na hemolinfa, sugerindo ser a hemolinfa capaz de estocar proteínas após a aclimação à salinidade. Dependendo da salinidade, as proteínas hemolinfáticas podem ser utilizadas como fonte de efetores osmóticos ou como energia metabólica (ROSAS e cols., 2001).

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) ocorre em ambientes estuarinos, desde o litoral sul do Rio de Janeiro, Brasil, até o Golfo de San Martin, Argentina (RATHBUN, 1981; BOSCHI, 1964). No Rio Grande do Sul, ele é encontrado em marismas (pântanos salgados). É um caranguejo que tolera uma exposição prolongada à água doce e a um meio com salinidade elevada. Este animal pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, pois suporta variações de salinidade de 0‰ a 40‰, hiper-regulando de 0‰ a 20‰ e hipo-regulando em 40‰. O ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e verão, respectivamente

(BROMBERG, 1992). Animais aclimatados a um meio de baixa salinidade mostram um aumento significativo da atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, principalmente nas brânquias posteriores, enquanto que a aclimação à alta salinidade diminui a atividade máxima dessa enzima, tanto em brânquias posteriores quanto anteriores (CASTILHO e cols., 2001). Essa espécie de caranguejo eurialino é um modelo biológico adequado para a investigação da ação da insulina sobre a atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias, em especial, em brânquias posteriores que assumem um papel importante na osmorregulação em crustáceos estuarinos.

OBJETIVOS

Verificar em *Chasmagnathus granulata* o efeito da administração de insulina de mamífero sobre a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, síntese de proteínas e captação de aminoácidos em brânquias (anteriores e posteriores), hepatopâncreas e músculo. Também determinar o efeito da insulina sobre a concentração de glicose hemolinfática e a concentração de proteínas totais em brânquias.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta e manutenção dos animais

O caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (CRUSTACEA-DECAPODA-*Grapsidae*), animal de ambientes estuarinos, tem uma ampla distribuição geográfica ao longo da costa da América do Sul, desde o litoral sul do Rio de Janeiro, no Brasil, até a Patagônia, na Argentina (BOSCHI, 1964). Encontrado em comunidades abundantes às margens de marismas da costa brasileira, habita o substrato areno-lodoso do mesolitoral superior e supralitoral, cavando tocas e galerias e deslocando-se para o mesolitoral e infralitoral para alimentação (BOTTO & IRIGOYEN, 1980).

Os animais utilizados no presente estudo foram coletados em um marisma tipicamente estuarino, na margem leste da Lagoa de Tramandaí, município de Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil (coordenadas 29° 58' latitude sul e 50° 08' longitude oeste), parcialmente coberto por vegetação haloidrófila e cortado por arroios que drenam a água de origem pluvial da planície costeira para o oceano. Esta região apresenta um clima subtropical úmido, com temperatura média anual de 17,6° C e precipitação pluviométrica inferior a 1300mm por ano (MORENO, 1961).

Com a permissão das autoridades do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis -IBAMA (licença 138/91 - Devies), os animais foram capturados no período de 2 anos (2000 - 2001), somente na primavera, verão e outono. No inverno, devido às condições adversas do tempo e diminuição da população de animais, torna-se difícil a captura.

Após a captura manual no sedimento areno-lodoso, na água ou nas tocas, os animais foram transportados até o laboratório em caixas plásticas contendo água do próprio local. A captura dos caranguejos foi seletiva, visando somente machos adultos no período C do ciclo

intermuda (DRACH & TCHERNIGOVZEFF, 1967), a fim de minimizar os possíveis efeitos fisiológicos do ciclo reprodutivo e de períodos de intermuda.

No laboratório, os animais foram colocados em um tanque com água destilada e submetidos a um choque hiposmótico por um período de 24 horas, com o propósito de limpar o seu conteúdo estomacal e eliminar parasitas (KUCHARSKI e col., 1997). Logo a seguir, eram transferidos para aquários com salinidade de 20 ‰ (salinidade que, segundo MAÑE-GARZON e cols., 1974, é semelhante ao ponto isosmótico de *C. granulata*), temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fotoperíodo natural e oxigenação constante.

Durante o período de aclimação (15 dias) os animais eram alimentados diariamente com carne bovina crua.

2. Procedimentos experimentais “in vivo”

Após o período de adaptação às condições de laboratório, os animais foram separados em dois grupos: o grupo I - Insulina e grupo II - Controle.

Grupo I - Insulina - Os animais eram pesados e 5 U/kg de insulina Suína Monocomponente ® 100 U/ml (Biobrás) diluída em Solução Fisiológica de Crustáceo (SFC) (NaCl 300 mM, KCl 10 mM, MgCL 10 mM, H₃BO₃ 8,8 mM, Hepes 10 mM, CaCl₂ 25 mM, pH 7,8) era injetada diariamente, durante 8 dias, sempre no período da manhã.

Grupo II - Controle - Os animais receberam doses diárias de 100µl de SFC pelo período de 8 dias. No primeiro dia de experimento, isto é, antes da primeira administração de insulina ao Grupo I e SFC ao Grupo II foi feita uma coleta de hemolinfa. No 3º, 5º e 7º foram coletadas amostras de hemolinfa. As coletas de hemolinfa eram realizadas entre o 1o, 2o e 3o par de pereiópodos, utilizando seringas com 40µl do anticoagulante oxalato de potássio a 10%. A hemolinfa foi colocada em tubos e congelada em freezer a -20°C para posterior análise. Durante os

8 dias do procedimento experimental os animais de ambos grupos foram mantidos nas mesmas condições de laboratório do período de aclimatação e continuaram a ser alimentados diariamente com carne bovina crua.

Os animais foram crioanestesiados por um período de 10 minutos. Após esse procedimento, foi removida a carapaça, as brânquias foram excisadas pela base e colocadas em placas de Petri umedecidas com SFC gelada após secas em papel filtro, pesadas e agrupadas.

2. 1. Preparação das membranas plasmáticas

O tecido branquial foi homogeneizado em solução tampão (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, Sacarose 250 mM e PMSF 1 mM, pH 7,4), na proporção de 5:1 (v/w), utilizando um homogeneizador de Teflon tipo Potter - Elvehjem sempre em banho de gelo. O homogeneizado foi imediatamente centrifugado por 5 minutos a 3000 xg em uma centrífuga Sorvall RC-5B a 4°C. O sobrenadante foi retirado com pipetas Pasteur e centrifugado por 20 minutos a 30.000 xg, a 4°C em uma centrífuga Sorvall RC-5B, enquanto que o precipitado foi descartado. O sobrenadante resultante desta centrifugação foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 250µl de tampão Hepes (25mM) e PMSF (1mM) com um homogeneizador de vidro Dounce. De cada amostra foram retirados 50µl para a determinação da concentração de proteínas e os 200µl restantes foram congelados para posterior determinação da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase.

2.2. Determinação da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase

A atividade da Na⁺-K⁺-ATPase foi determinada utilizando-se o método descrito por ESMANN (1988) e adaptado para as condições do caranguejo. Em um conjunto de tubos de vidro de 3ml, numerados de acordo com o número de amostras (extrato de brânquias anteriores e brânquias posteriores dos indivíduos amostrais do grupo I e do grupo II) e colocados em banho de gelo, foi colocado o Meio I (500µl da solução A- NaCl 200 mM; KCl 60 mM; MgCl₂ 10 mM;

Imidazole 40 mM; 50ml água milliQ; 250µl ATP 20 mM; 250µl solução álcool: água - 200µl etanol absoluto e 800µl água milliQ), enquanto que em outro conjunto de tubos, com a mesma numeração do anterior, foi colocado o Meio II (500µl solução B - NaCl 200 mM; MgCl₂ 10 mM; Imidazole 40 mM; 50ml água milliQ; 250µl ATP 20 mM; 250µl ouabaína 4m M). Os dois conjuntos de tubos eram imediatamente colocados em banho metabólico a 30°C por 5 minutos. Em todos os tubos dos dois conjuntos foram pipetados 50µl (equivalente a 50µg de proteína) das respectivas amostras (extrato de brânquias anteriores e brânquias posteriores dos indivíduos amostrais do grupo I e do grupo II). Após ser pipetada a amostra no 1º tubo com o Meio I, esperou-se 30 segundos e, seqüencialmente, foram pipetadas as amostras nos tubos restantes do Meio I e do Meio II, observando um intervalo de 30 segundos entre cada tubo. Trinta minutos após o início da reação, foi acrescentado 300µl de TCA 1mM em todos tubos dos dois meios, observando o intervalo de 30 segundos já estabelecido anteriormente. Com o TCA 1mM a reação era interrompida com a conseqüente liberação de Pi para o meio de reação. Toda a reação foi realizada no escuro.

Os tubos foram imediatamente retirados do banho metabólico e congelados para posterior determinação de Fósforo inorgânico.

3. Procedimento experimentam "in vitro"

3.1. Síntese de proteínas

A síntese de proteínas em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo mandibular de animais experimentais - grupo I (tratamento com insulina) e animais controles - grupo II, foi determinada segundo método descrito por RICHARDSON e col. (1997).

Porções (40 - 100 mg) do hepatopâncreas, do músculo mandibular e das brânquias anteriores e posteriores, foram retiradas e colocadas em tubos de 2ml contendo 500µl SFC gelada (pH 7,8) acrescida de HEPES 10 mM, fenilmetilsufonil fluoride (PMSF) 0,1 mM, 0,2µCi de L-

leucina-U-¹⁴C (310 mCi/mmol - Amersham International) e 5 mM L-leucina. Nas brânquias, foram feitos pequenos cortes nas lamelas e retiradas as artérias aferente e eferente para possibilitar maior contato do tecido com o meio de incubação.

Após aeração de 30 segundos com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v), os tubos foram incubados em banho metabólico a 25° C, sob agitação constante, por um período de 4 horas.

Foi determinado o tempo de 4 horas de incubação com base em um experimento-piloto, que testou os tempos de incubação *versus* a síntese protéica em hepatopâncreas, músculo e brânquias anteriores e posteriores (SCHEIN, 1999).

Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Os tecidos foram lavados por três vezes em SFC gelada, para tirar o excesso de radioatividade, secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 500µl de água bidestilada. As amostras foram homogeneizadas com um macerador de tecidos (Marca OMNI MIXER) e, após, uma parte de cada amostra foi processada para a quantificação das proteínas totais (BRADFORD, 1976), utilizando albumina bovina como padrão.

A outra parte de cada amostra foi processada para a quantificação da incorporação de ¹⁴C-leucina em proteínas totais. Um volume de 250µl das amostras foi pipetado em filtros de microfibras de vidro (GF/B, 24mm, Whatman). Após, os filtros foram lavados em TCA 10% por 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das ¹⁴C-proteínas. A seguir, os filtros foram lavados duas vezes em álcool 95% e duas vezes em éter. Uma vez secos, os filtros foram embebidos 5ml de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade quantificada em contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos em nmoles de L-U-leucina-¹⁴C incorporados em proteínas. mg⁻¹ de proteínas. por tempo de incubação.

3.2. Captação de aminoácidos

Porções de 40-100mg de hepatopâncreas, 30-90mg de brânquias anteriores e posteriores (direita e esquerda) e 30-60mg de músculo mandibular foram utilizadas nesses experimentos.

Nas brânquias, foram feitos pequenos cortes nas lamelas e retiradas as artérias aferente e eferente para possibilitar maior contato do tecido com o meio de incubação. Após secagem em papel filtro, os tecidos foram colocados em tubos de 2ml, contendo 500µl de SFC gelada, HEPES 10 mM e 0,2µCi de ácido amino-isobutírico AIB-¹⁴C (250µCi/mmol, Amersham International). Os tubos foram pesados antes de receber as amostras.

Os tubos foram pesados novamente para a determinação do peso dos tecidos e, a seguir, foi feita a substituição da fase gasosa por carbogênio (O₂:CO₂, na proporção 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff, sob agitação constante a 25°C, durante 120 minutos. Este tempo de incubação foi determinado por KUCHARSKI (1997) como o tempo mais adequado para esta metodologia em *C. granulata*. Após o período de incubação, as reações teciduais eram interrompidas em banho de gelo. As amostras de tecido foram retiradas do meio de incubação, lavadas três vezes em SFC gelada, secas em papel filtro e colocadas em tubos pirex com tampa, contendo 1 ml de água bidestilada.

Os tubos foram congelados a -20°C e depois fervidos por 30 minutos. Este procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, com o objetivo de romper as células para ocorrer a liberação da radioatividade captada por elas, sendo que este meio foi considerado o meio interno e o meio de incubação foi considerado o meio externo.

Amostras de 100µl do meio interno e do externo foram dissolvidas em 5ml de coquetel de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) mais 500µl de água bidestilada. A radioatividade foi medida com um contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T / M: dpm / ml meio interno por dpm / ml do meio de incubação).

5. Determinações bioquímicas

5.1. Concentração de glicose na hemolinfa

Os valores de glicose na hemolinfa foram determinados pelo método enzimático de Glicose-Oxidase, com kit Glicose Enz-Color (Bio Diagnóstica Indústria Clínica Ltda.) e os resultados foram expressos em $\text{mg}^{-1} \cdot 100 \text{ ml}$.

5.2. Dosagem de fósforo inorgânico

Para determinação do Fósforo inorgânico (Pi), produzido a partir da atividade da $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -ATPase foi utilizado o método de CHAN, 1986.

Como primeiro passo deste método, foram preparadas soluções-estoque de reagentes para a determinação do fósforo: 28,6g de molibdato de amônio dissolvido em 500ml de HCl 6 N, 11,6g álcool polivinílico dissolvido em 500ml de água milliQ fervente, 0,812g de verde malaquita dissolvido em 1000ml de água milliQ. A preparação da mistura reagente foi feita utilizando-se: verde malaquita, água milliQ, molibdato de amônio, álcool polivinílico (2:2:1:1 v/v).

A mistura reagente era preparada no dia da sua utilização, a temperatura ambiente, sob agitação constante, por um período de 30 minutos, apresentando, ao final, uma coloração amarelo-ouro, prova de não ter ocorrido contaminação com fósforo. Com o objetivo de evitar a contaminação da vidraria utilizada no experimento, e remover os resíduos de fósforo inorgânico (Pi), a mesma era lavada várias vezes com água bidestilada e NaOH 30% e enxaguada várias vezes com água milliQ.

Findo esse procedimento, as amostras eram descongeladas e centrifugadas por 2 minutos à 2000 rpm caso estivessem turvas. Logo a seguir, em tubos de ensaio foram pipetados 40 μ l de

amostra, 2000 μ l da mistura reagente, 760ml de água milliQ, enquanto que o tubo denominado branco recebia 2000 μ l da mistura reagente, 10 μ l de TCA 1mM e 790 μ l de água milliQ.

A leitura da absorbância (630nm) das amostras e do branco foi feita em espectrofotômetro (Cary 3E Varian).

Os valores de leitura da absorbância para cada amostra, em meio de reação I e em meio de reação II, foram calculados através da equação da reta - equação da reta para a curva padrão da concentração de fósforo de uma solução - e subtraídos entre si. O valor obtido, expresso em nmoles⁻¹.ml, foi dividido pelo volume da amostra (50 μ l para cada uma das amostras). O resultado desta divisão, expresso em μ moles.ml⁻¹, é dividido pela quantidade de proteínas (mg) em 1000 μ l de amostra. Este valor (μ moles Pi.mg⁻¹ proteína) foi dividido por 15 (minutos) para se obter a atividade de Pi por minuto e multiplicado por 60 para expressar a atividade enzimática em μ moles Pi. mg⁻¹ proteínas.h⁻¹.

Para determinação da curva padrão da concentração de fósforo de uma solução de K₂HPO₄ a 200 nmoles .ml⁻¹, em tubos de ensaio de vidro, denominados P₁, P₂, P₃, P₄, eram pipetados respectivamente 10, 20, 30 e 50 μ l da solução padrão de K₂ HPO₄, 10 μ l de TCA 10%, 780 μ l de água milliQ e 2000 μ l da mistura reagente. A leitura da absorbância dos padrões foi feita em espectrofotômetro (Cary 3E Varian) e os valores inseridos no computador para calcular a curva padrão da concentração de fósforo na solução padrão.

5.3. Concentração de proteínas

Para a determinação da concentração de proteínas das amostras, expressa em mg¹. ml, foi utilizado o método de Bradford (1976), utilizando como padrão albumina bovina (Sigma). A leitura da absorbância (595nm) foi realizada em um espectrofotômetro (Cary 3E Varian).

Tendo como base de cálculo a equação da reta da curva padrão de albumina sérica bovina previamente estabelecida, foram feitos os cálculos para determinação da concentração de proteínas das amostras utilizando os valores obtidos na leitura da absorbância das mesmas.

6. Tratamento Estatístico

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois pontos foi feita utilizando Teste t de Student para dados não pareados. Para as curvas de tempo ou de tratamento foi feita a análise de variância ANOVA de uma via, com teste de comparação de Tukey (Tukey Test). As diferenças entre as médias eram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas com o Programa SigmaStat versão 2.0 e versão 2.03, compatíveis com o Windows 95 e com o Windows XP, respectivamente.

RESULTADOS

1. Efeito da Insulina sobre a concentração de glicose na hemolinfa de caranguejos *C. granulata*

Na figura 1 estão representadas as concentrações de glicose na hemolinfa dos grupos controle e tratado com insulina. Nos grupos que receberam insulina e SFC durante 8 dias não foram constatados aumentos significativo ($P>0,05$) dos valores de glicose na hemolinfa.

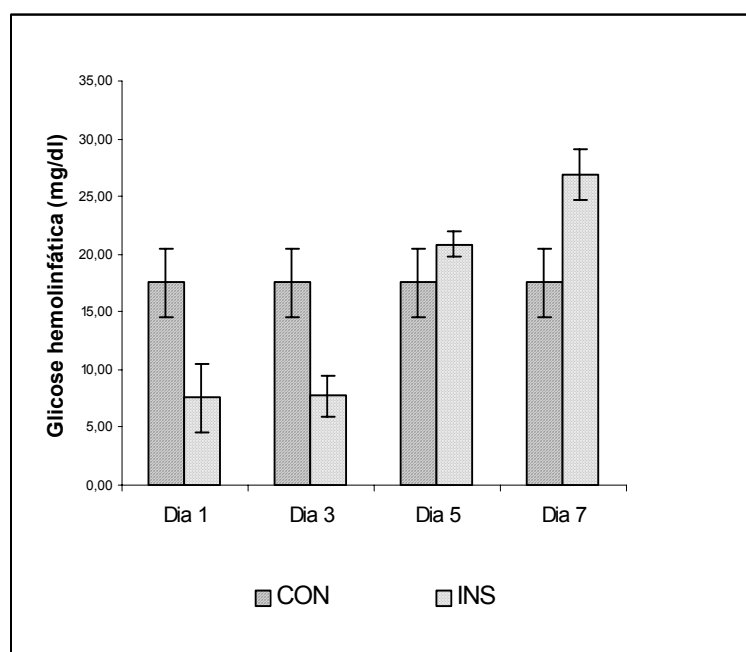


Figura 1. Concentração de glicose hemolinfática em *C. granulata*. CON - hemolinfa de animais controle; INS - hemolinfa de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número de animais foi de 8-30 por grupo.

2. Efeito da Insulina sobre a síntese de ^{14}C -proteínas em hepatopâncreas, músculo da mandíbula e brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *C. granulata*

2.1. Síntese protéica em hepatopâncreas

Na figura 2 estão representados os valores da incorporação de L-leucina- ^{14}C em ^{14}C -proteínas em hepatopâncreas de animais controle e de animais tratados com Insulina. Os valores mostram que a síntese protéica em hepatopâncreas de animais tratados com insulina aumentou aproximadamente 17%, quando comparada com os animais controle. A variação não foi estatisticamente significativas ($P>0,05$).

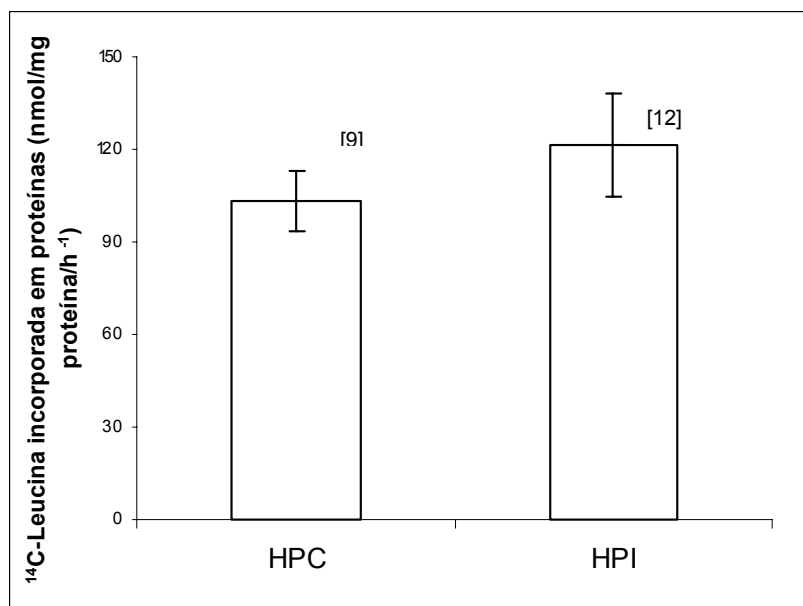


Figura 2. Síntese de ^{14}C -proteína em hepatopâncreas de *C. granulata*, a partir de L-leucina- ^{14}C . HPC - hepatopâncreas de animais controle; HPI - hepatopâncreas de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

2.2. Síntese protéica em músculo da mandíbula

Os valores da incorporação de L-leucina-U- ^{14}C em ^{14}C -proteínas em músculo da mandíbula de animais controle e de animais tratados com Insulina estão representados na figura 3. Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) entre os dois grupos de animais.

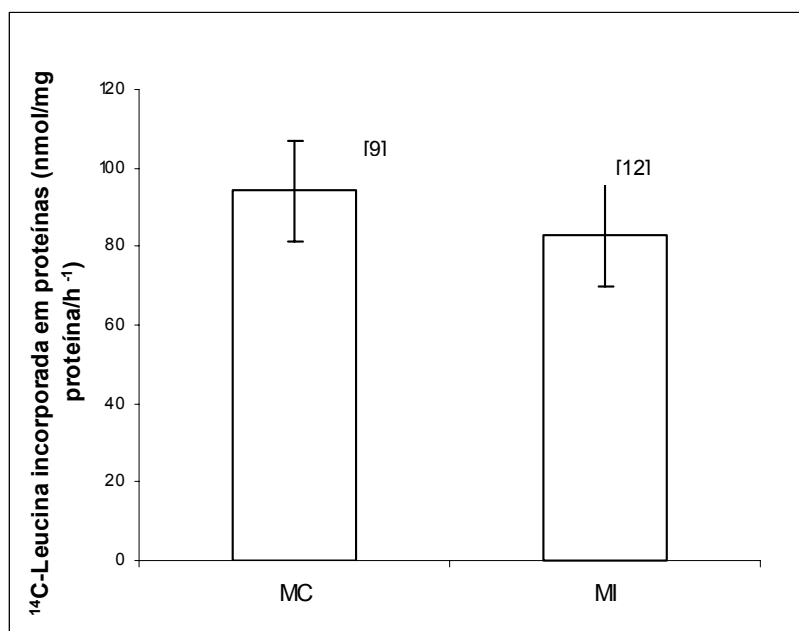


Figura 3. Síntese de ^{14}C -proteína em músculo da mandíbula de *C. granulata* a partir de L-leucina-U- ^{14}C . MC - músculo da mandíbula de animais controle; MI - músculo da mandíbula de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

2.3. Síntese protéica em brânquias anteriores e em brânquias posteriores

As figuras 4 e 5 mostram, respectivamente, os valores de incorporação de L-leucina-U- ^{14}C em proteínas em brânquias anteriores e posteriores de animais controle e de caranguejos tratados com Insulina. Não foi constatada variação significativa na capacidade de síntese de ^{14}C -proteínas entre as brânquias posteriores e anteriores do grupo controle.

Entre o grupo controle e Insulina não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) nos valores de incorporação de L-leucina-U- ^{14}C em ^{14}C -proteínas tanto em brânquias anteriores quanto em brânquias posteriores.

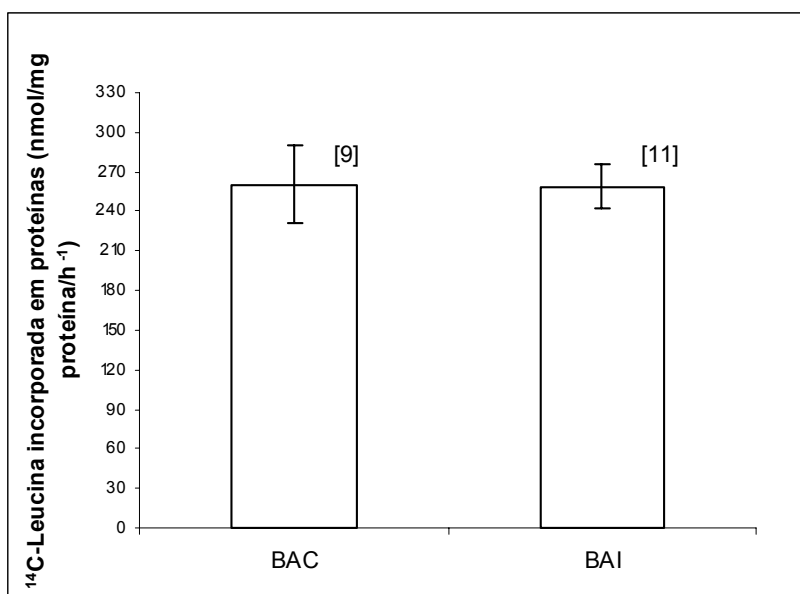


Figura 4. Síntese de ^{14}C -proteína em brânquias anteriores de *C. granulata* a partir de L-leucina-U- ^{14}C . BAC - brânquias anteriores de animais controle; BAI - brânquias anteriores de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

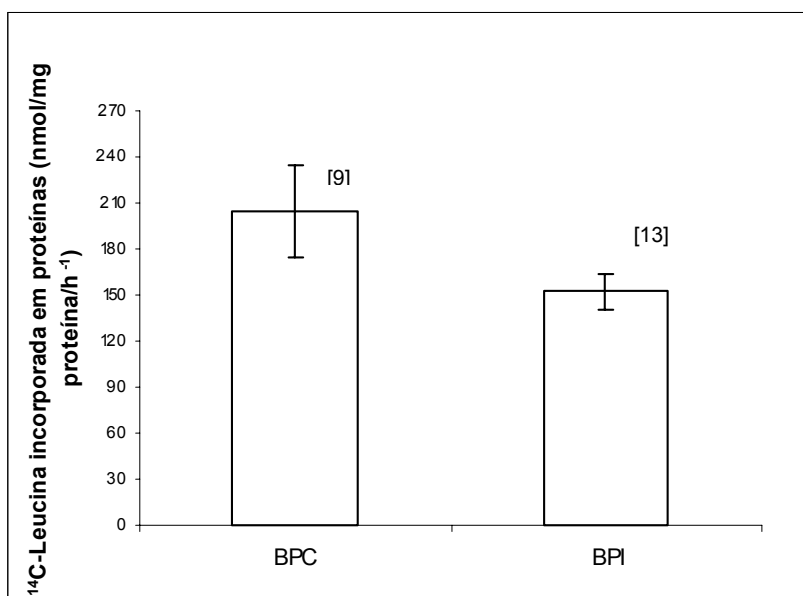


Figura 5. Síntese de ^{14}C -proteína em brânquias posteriores de *C. granulata* a partir de L-leucina- $U\text{-}^{14}\text{C}$. BPC - brânquias posteriores de animais controle; BPI - brânquias posteriores de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

3. Efeito da Insulina sobre a captação de [^{14}C]Ácido amino-isobutírico (AIB) em brânquias anteriores e posteriores, hepatopâncreas e músculo da mandíbula de caranguejos *C. granulata*

3.1. Captação [^{14}C]ácido amino-isobutírico em brânquias anteriores e posteriores

A figura 6 mostra os valores de captação de [^{14}C]ácido amino-isobutírico (AIB) em brânquias anteriores de animais controle e de animais tratados com Insulina. Não foi constatada variação significativa na relação T/M entre as brânquias posteriores e anteriores do grupo controle.

Entre o grupo controle e Insulina não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$) nos valores de captação de AIB- ^{14}C em brânquias anteriores.

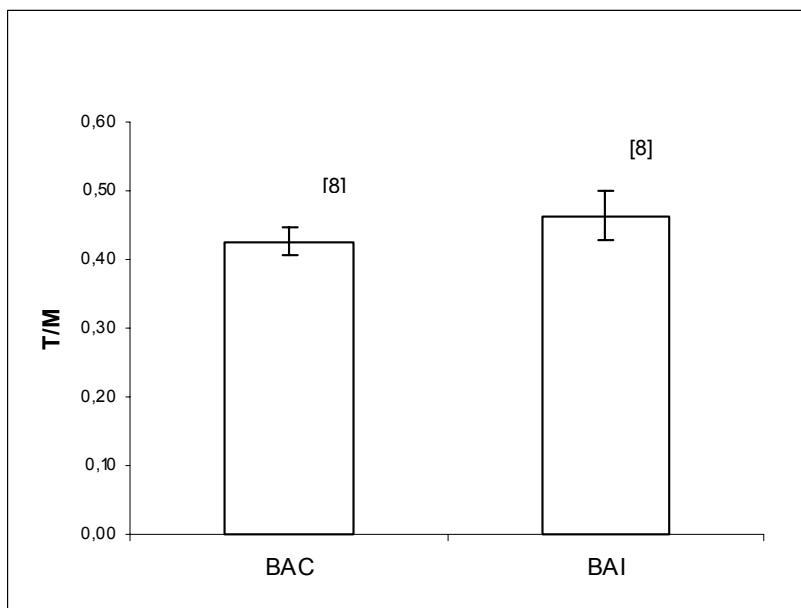


Figura 6. Captação de ^{14}C ácido amino-isobutírico (AIB) em brânquias anteriores de *C. granulata*, expressa pela relação tecido/meio - T/M. BAC - brânquias anteriores de animais controle; BAI - brânquias anteriores de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

A figura 7 mostra os valores de captação de ^{14}C ácido amino-isobutírico (AIB) em brânquias posteriores de animais controle e de animais tratados com Insulina. Os números mostram que a captação de ^{14}C ácido amino-isobutírico nas brânquias posteriores de animais tratados com Insulina foi 34% maior do que nas brânquias posteriores dos animais controle. A diferença observada é estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

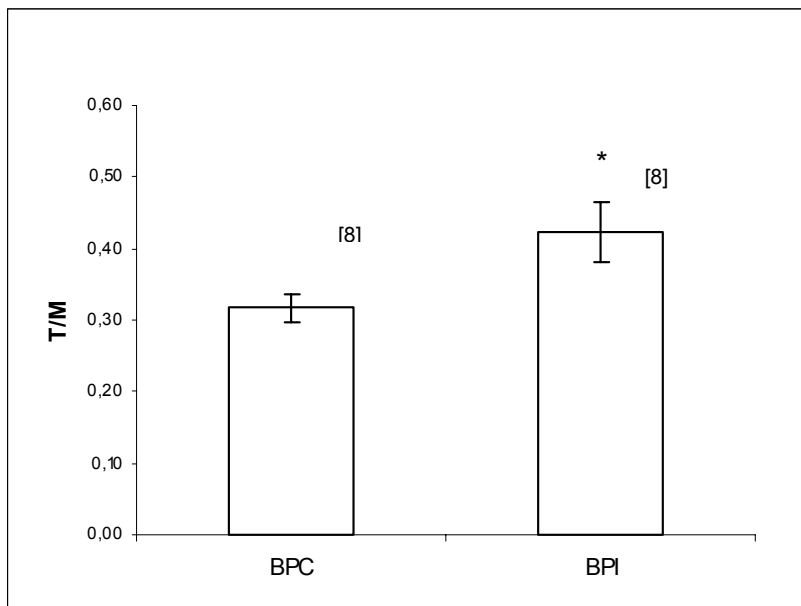


Figura 7. Captação de [14 C]ácido amino-isobutírico (AIB) em brânquias posteriores de *C. granulata*, expressa pela relação tecido/meio - T/M. BPC - brânquias posteriores de animais controle; BPI - brânquias posteriores de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes. * ($P < 0,05$) em relação ao grupo BPC.

3.2. Captação [14 C]ácido amino-isobutírico em hepatopâncreas

A figura 8 mostra os valores de captação de [14 C]ácido amino-isobutírico (AIB) em hepatopâncreas de animais controle e de animais tratados com Insulina. A captação de [14 C]ácido amino-isobutírico no hepatopâncreas de animais tratados com Insulina foi 25% maior do que no hepatopâncreas de animais controle. A diferença observada é estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

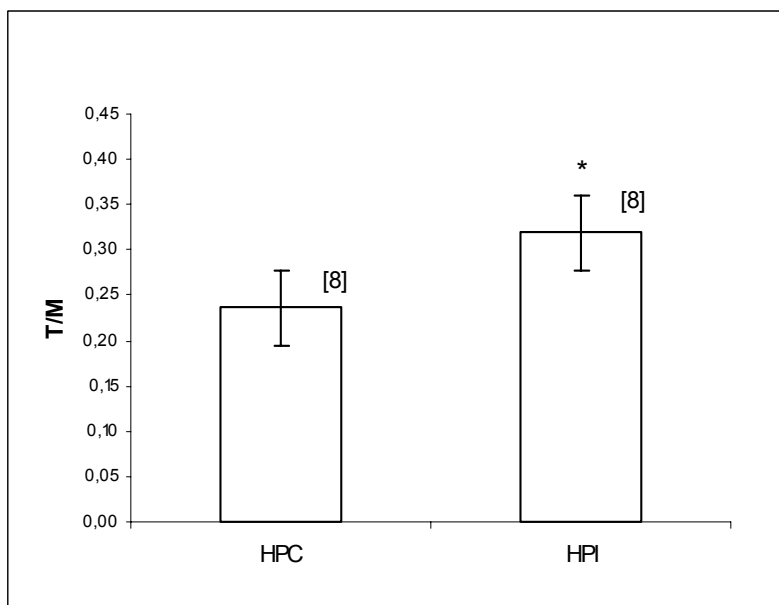


Figura 8. Captação de [^{14}C]ácido amino-isobutírico (AIB) em hepatopâncreas de *C. granulata*, expressa pela relação tecido/meio - T/M. HPC - hepatopâncreas de animais controle; HPI - hepatopâncreas de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes. * ($P < 0,05$) em relação ao grupo BPC.

3.3. Captação [^{14}C]ácido amino-isobutírico em músculo

A figura 9 apresenta a comparação entre os valores de captação de [^{14}C]ácido amino-isobutírico (AIB) em músculo mandibular de animais controle e de animais tratados com Insulina. A comparação dos valores de captação de [^{14}C]ácido amino-isobutírico em músculo da mandíbula entre os animais controles e os tratados com insulina não apresenta diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

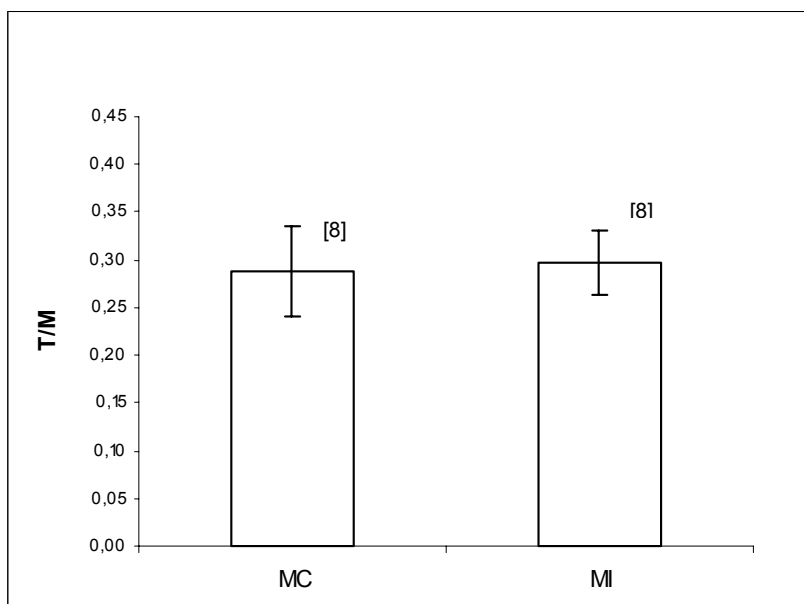


Figura 9. Captação de [^{14}C]ácido amino-isobutírico (AIB) em músculo da mandíbula de *C. granulata*, expressa pela relação tecido/meio - T/M. MC - músculo da mandíbula de animais controle; MI - músculo da mandíbula de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

4. Efeito da Insulina na atividade específica $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *C. granulata*

Na figura 10 a comparação entre os valores da atividade específica $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias anteriores de animais controle e de animais tratados com Insulina mostra que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os dois grupos de animais.

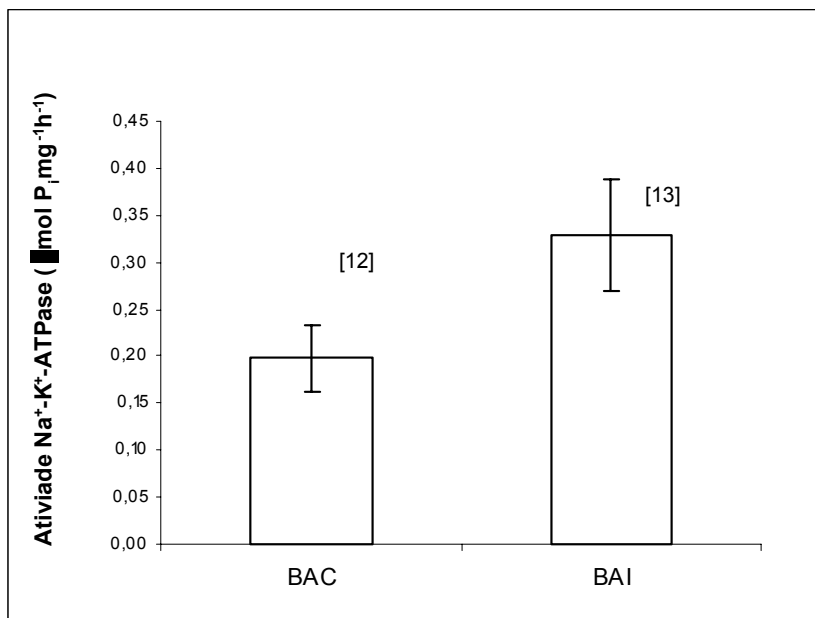


Figura 10. Atividade específica $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias anteriores de *C. granulata*. BAC - brânquias anteriores de animais controle; BAI - brânquias anteriores de animais tratados com insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

A figura 11 mostra os valores da atividade específica $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias posteriores de animais controle e de animais tratados com Insulina. Os valores indicam que a atividade específica $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores dos animais tratados com Insulina foi maior do que nos animais controle. A diferença entre os dois grupos de animais é estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

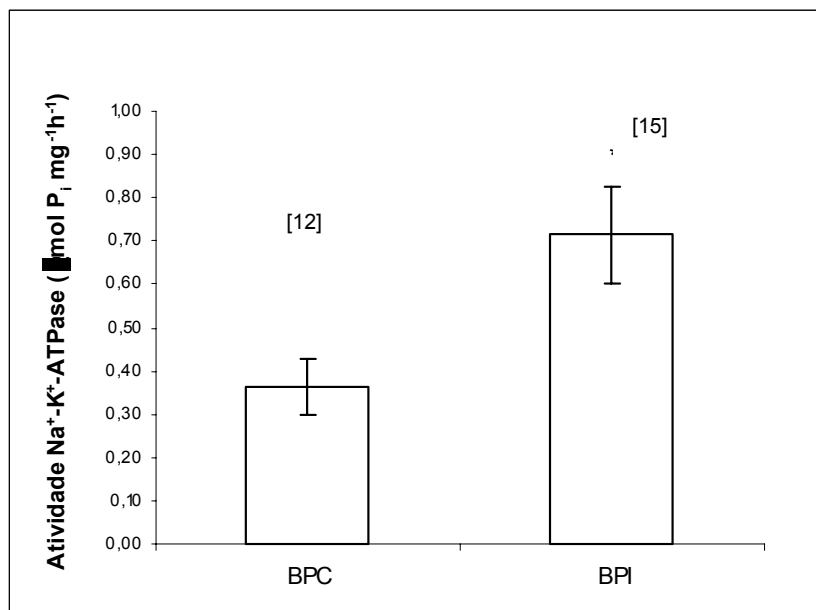


Figura 11. Atividade específica Na⁺-K⁺-ATPase em brânquias posteriores de *C. granulata*. BPC - brânquias posteriores de animais controle; BPI - brânquias posteriores de animais tratados com insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes. * ($P < 0,05$) em relação ao grupo BPC.

A figura 12 mostra os valores da atividade específica da Na⁺-K⁺-ATPase em brânquias posteriores e posteriores de animais do grupo controle. Os valores indicam que a atividade específica Na⁺-K⁺-ATPase nas brânquias posteriores foi significativamente ($p < 0,05$) maior do que aquela constatada nas brânquias anteriores.

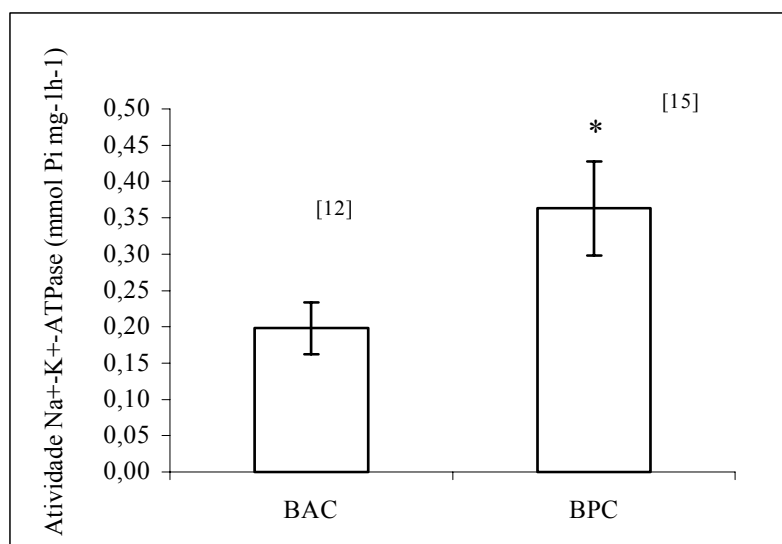


Figura 12. Atividade específica $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias posteriores e anteriores do grupo controle de *C. granulata*. BAC - brânquias posteriores de animais controle; BPC - brânquias posteriores de animais controle. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número de animais foi de 8-30 por grupo. * ($P < 0,05$) em relação ao grupo BAC.

6. Efeito da Insulina sobre a concentração de proteínas totais em brânquias anteriores e brânquias posteriores de caranguejos *C. granulata*

Não foi constatada variação significativa dos valores de proteínas totais entre as brânquias posteriores ($2,75 \pm 0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$) e anteriores ($2,5 \pm 0,25 \text{ mg.ml}^{-1}$) do grupo controle.

6.1. Proteínas totais em brânquias anteriores

Na figura 13 estão representados os valores das concentrações de proteínas totais em brânquias anteriores de animais controle e de animais tratados com Insulina. Não foram

observadas variações significativas ($P>0,05$), entre os animais tratados com insulina e os controles, na concentração de proteínas totais nas brânquias anteriores.

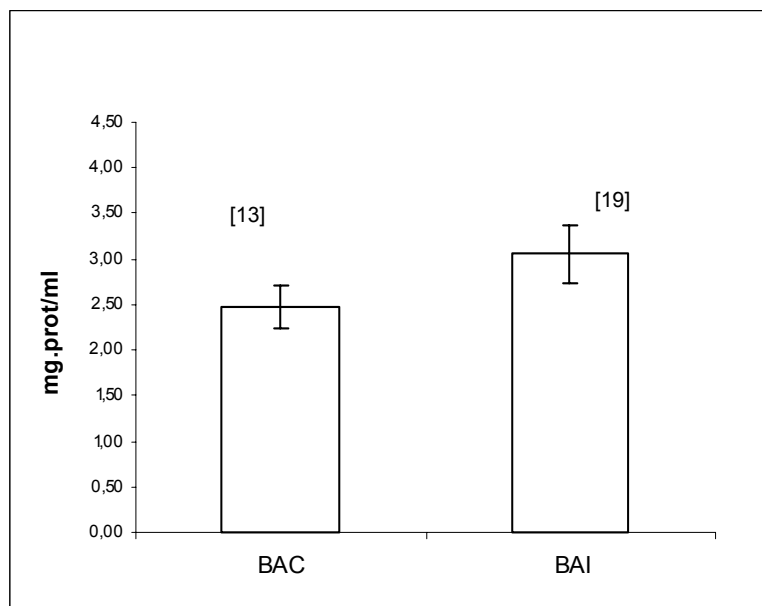


Figura 13. Concentração de proteína em brânquias anteriores de *C. granulata*. BAC - brânquias anteriores de animais controle; BAI - brânquias anteriores de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

6.2. Proteínas totais em brânquias posteriores

Na figura 14 estão representados os valores das concentrações de proteínas totais em brânquias posteriores de animais controle e de animais tratados com Insulina. Não foram observadas variações significativas ($P>0,05$) na concentração de proteínas totais nas brânquias anteriores dos animais tratados com Insulina, quando comparada àquela do grupo controle.

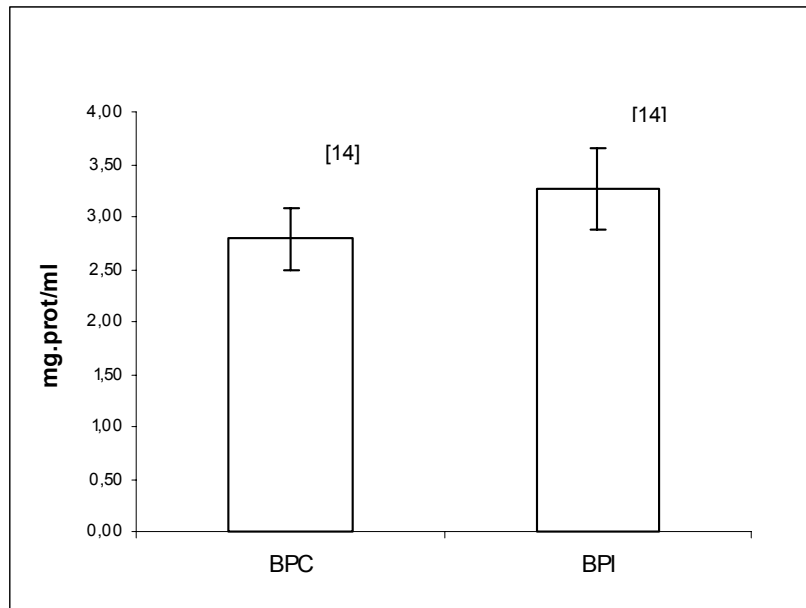


Figura 14. Concentração de proteína em brânquias posteriores de *C. granulata*. BPC - brânquias posteriores de animais controle; BPI - brânquias posteriores de animais tratados com Insulina. As colunas e as barras representam as médias \pm EPM. O número amostral está representado entre colchetes.

DISCUSSÃO

A glicose, que é o principal substrato energético em crustáceos e a principal hexose na hemolinfa desses animais (HERREID & FULL, 1988; MORRIS & AIRRIESS, 1998), apresenta flutuações marcantes, que dependem de fatores como: estágio de muda, variação sazonal, composição da dieta, estado alimentar, ciclo circadiano, concentração do hormônio hiperglicêmico, salinidade e oxigenação da água (CHANG & O' CONNOR, 1983; MORRIS & AIRRIESS, 1998).

A insulina de mamíferos quando administrada em crustáceos parece não exercer um papel glicostático (LEINEN & McWHINNIE, 1971; SANDERS, 1983 a ;b; FINGERMAN e cols., 1993). Talvez os níveis de glicose circulante em crustáceos sejam controlados através do sistema endócrino via hormônio hiperglicêmico e por fatores neuroendócrinos (serotonina, dopamina, GABA, leu-leucina e outros) (ROTHER e cols., 1991; FINGERMAN e cols., 1993; SAROJINI e cols., 1995). No presente trabalho a administração de insulina ao caranguejo durante 8 dias não alterou significativamente os valores de glicose na hemolinfa. Esse resultado confirma os dados obtidos por KUCHARSKI (1997) que não verificou variação significativa na concentração de glicose circulante em *C. granulata* após o tratamento com insulina bovina.

Como uma molécula com atividade insulínica ainda não foi isolada em crustáceos, foi utilizada nos experimentos aqui descritos a insulina suína. Vários trabalhos demonstraram que a insulina suína estimula *in vitro* a glicogênese e a captação de glicose em músculos e

brânquias de diversos crustáceos (SANDERS, 1983b; HAGAR & BITTAR, 1985; WELCOMME & DEVOS, 1994), inclusive em brânquias posteriores de *C. granulata* (KUCHARSKI e cols., 2002). Além disso, a insulina de mamífero tem sido usada em vários trabalhos sobre receptores de insulina em insetos, moluscos e crustáceos (PETRUZZELLI e cols., 1984; CHUANG & WANG, 1993; YAMAGUCHI e cols., 1995; JONAS e cols., 1996; KUCAHRSKI e cols., 1997; KUCHARSKI e cols., 1999). A concentração de insulina suína utilizada nestes experimentos foi elevada quando comparada àquela utilizada em trabalhos com mamíferos. Contudo, a dose escolhida para os experimentos descritos nesta Dissertação é similar àquelas utilizadas em *C. granulata* por KUCHARSKI (1997), em *Strophocheilus oblongus* por MARQUES & FALKMER (1976) e em *Cherax quadricarinatus* por RICHARDSON e cols. (1997).

Em peixes e crustáceos, LYNDON & HOULIHAN (1998) mostraram que o tecido mais ativo em termos de síntese de proteínas é o branquial, seguido pelo fígado e hepatopâncreas, músculo e coração. SCHEIN e cols. (2003) obtiveram em *C. granulata* valores de síntese de proteínas no tecido branquial significativamente maiores que os obtidos no hepatopâncreas e no músculo. Os resultados deste trabalho confirmam os dados de SCHEIN e cols. (2003) e VINAGRE & DA SILVA (2002), pois a síntese de proteínas nas brânquias (posteriores e anteriores) foi cerca de 2 a 3 vezes maior do que àquela no músculo mandibular e no hepatopâncreas. O tecido branquial apresenta uma grande área de superfície exposta ao meio ambiente, devido a função respiratória e osmorreguladora. Acredita-se que mesmo em situações adversas de temperatura, salinidade e restrição alimentar a capacidade de síntese de proteínas nas brânquias seja mantida, devido a importância deste órgão para a sobrevivência do animal. Em *C. granulata* submetido ao

estresse hiperosmótico a síntese de proteínas nas brânquias posteriores aumentou 66% quando comparada àquela do grupo controle (SCHEIN e cols., 2003). Contudo, o jejum de 3 três semanas não alterou significativamente a síntese de proteínas em brânquias de *C. granulata* (VINAGRE & Da Silva, 2002).

O efeito anabólico da insulina sobre o metabolismo de proteínas é filogeneticamente muito antigo, tendo sido demonstrado em diversas classes de vertebrados (NORRIS, 1997). A ação da insulina sobre a síntese de proteínas no músculo parece ser a mais primitiva atividade biológica desse hormônio em vertebrados (INUI & GORBMAN, 1978; PLISETSKAYA e cols., 1984). Em invertebrados a maior parte dos estudos sobre o efeito metabólico da insulina focalizam a ação deste hormônio sobre o metabolismo de carboidratos (SANDERS, 1983 a,b; HAGAR & BITTAR, 1985; WELCOMME & DEVOS, 1994; MARQUES & FALKMER 1976; RICHARDSON e cols., 1997; KUCHARSKI e cols., 2002). Não foi encontrado nenhum trabalho abordando o efeito da insulina de mamíferos sobre a síntese de proteínas em invertebrados. A administração de insulina suína durante 8 dias não modificou significativamente a concentração e a síntese de proteínas nas brânquias anteriores e posteriores em *C. granulata*. Neste caranguejo a presença de receptores para insulina foi constatada em brânquias anteriores e posteriores, contudo, *in vitro*, este hormônio estimulou a captação de glicose e síntese de glicogênio somente nas brânquias posteriores (KUCHARSKI e cols. 1997, KUCHARSKI e cols., 2002). Recentemente a clonagem parcial do receptor de insulina (CIR) foi realizada a partir do tecido branquial (TRAPP e cols., 2002). Também a incorporação de ¹⁴C-Leucina em proteínas, no hepatopâncreas e músculo mandibular de *C. granulata*, não foi alterada com o tratamento com insulina suína durante 8 dias. Em vertebrados, em especial nos mamíferos,

a insulina controla as funções anabólicas (síntese de carboidratos, de lipídios e de diversas proteínas), e os IGFs regulam diretamente o crescimento e o desenvolvimento a nível celular (THORPE & DUVE, 1984; CHAN & STEINER, 2000). Entretanto em invertebrados, os peptídios similares à insulina apresentam tanto funções metabólicas como de crescimento e diferenciação (CHAN & STEINER, 2000). Nenhum peptídio semelhante à insulina com efeito metabólico preponderante foi constatado em invertebrados (CHAN & STEINER, 2000). No lagostim *C. quadricarinatus* a administração de IGF-I aumentou a incorporação de ¹⁴C-leucina em proteínas no músculo e hepatopâncreas (RICHARDSON e cols., 1997). Os autores sugerem o envolvimento do IGF-I nos processos de crescimento e metabólico nesse crustáceo, contudo, o efeito da insulina sobre o metabolismo de proteínas não foi avaliado em *C. quadricarinatus* (RICHARDSON e cols., 1997). Estudos futuros utilizando IGF-I serão necessários em *C. granulata* para esclarecer o efeito do sistema insulina/IGF-I sobre o metabolismo de proteínas em crustáceos. A existência de uma molécula semelhante ao IGF-I em crustáceos foi sugerida através da detecção de RNAm em tecidos do caranguejo *Cancer productus* e da lagosta *Homarus americanus* (CHANG e cols., 1995).

A concentração de aminoácidos livres intracelulares em crustáceos é cerca de 10 vezes maior que a constatada em mamíferos. Nesses animais, os aminoácidos livres nos tecidos são os principais compostos orgânicos osmoticamente ativos, destacando-se a arginina, alanina, glicina, prolina, ácido glutâmico e a taurina. Aproximadamente 50% da pressão osmótica intracelular resulta da presença dos aminoácidos livres (GILLES, 1982; ROBERTSON, 1992; BISHOP & BURTON, 1993; GILLES, 1997).

Diversos trabalhos demonstraram que a concentração de aminoácidos livres nos tecidos aumenta em crustáceos e moluscos submetidos ao estresse hiperosmótico (MATSUSHIMA & HAYASHI, 1992; DRAGOLOVICH & PIERCE, 1992; BISHOP & BURTON, 1993; OKUMA & ABE, 1994; BISHOP et al., 1994; GILLES & DELPIRE, 1997; GILLES, 1997). Em crustáceos decápodos as proteínas hemolinfáticas e tissulares são fontes de aminoácidos livres durante o estresse osmótico (KOENING, 1981; TAN & CHOONG, 1981; FREIRE et al., 1995).

Os caranguejos do presente trabalho foram alimentados com carne bovina durante 15 dias. Entretanto, SCHEIN e cols. (2003) não constataram diferenças significativas das concentrações de glicina, serina, arginina, alanina e prolina, principais aminoácidos na hemolinfa do *C. granulata*, entre caranguejos alimentados com uma dieta rica em carboidratos e aqueles mantidos com a dieta rica em proteínas.

A captação de aminoácidos em tecidos animais ocorre através de diferentes tipos de sistemas de transporte, que são identificados de acordo com suas propriedades cinéticas e suas especificidades. Os sistemas A, ASC, X_c⁻ e N^m são sensíveis à insulina, enquanto o sistema L é insensível (TESSARI, 1994).

O ¹⁴C-AIB é amplamente utilizado para o estudo de transporte de aminoácidos em vertebrados, ele não é metabolizado pelas células e é acumulado no seu interior de maneira semelhante aos aminoácidos naturais (SEGAL e cols., 1966). Segundo SHOTWELL (1981), o transporte de AIB é feito através de dois mecanismos: o sistema A (ativo dependente de sódio) e o sistema L (difusão facilitada).

O tratamento do caranguejo *C. granulata* por 8 dias com insulina bovina aumentou significativamente a captação de ^{14}C -AIB em brânquias posteriores e no hepatopâncreas. Em *C. granulata*, EICHLER (2001) constatou que o transporte de aminoácidos nas brânquias posteriores ocorre tanto através do sistema A, dependente de sódio, como do sistema L, independente de sódio, pois na ausência deste íon a captação do ^{14}C -AIB, embora tenha diminuído, não foi inibida completamente. Ainda, a autora sugere que o sistema A de transporte é mais ativo no verão, talvez relacionado com um aumento da salinidade da água no habitat do *C. granulata* nessa época do ano. AHEARN (1983) verificou a presença de um mecanismo de transporte do aminoácido alanina, mediado por um carreador dependente do íon sódio, em células F do hepatopâncreas da lagosta *Homarus americanus*. Os resultados do presente trabalho sugerem que em *C. granulata* o aumento da captação de ^{14}C -AIB em brânquias posteriores e hepatopâncreas após o tratamento com insulina ocorre através do sistema A sensível à insulina. O papel da substância semelhante à insulina em invertebrados ainda é pouco conhecido, contudo, o seu envolvimento no processo de osmorregulação foi uma das funções postuladas para este hormônio (EPPLÉ & BRINN, 1987). A identificação das brânquias posteriores e do hepatopâncreas como tecidos alvo da ação da insulina sobre o metabolismo de proteínas em crustáceos é esclarecedor para a identificação do papel deste hormônio em invertebrados. Considerando que estes caranguejos vivem em um estuário onde a salinidade varia de 0,22‰ a 34‰ e que as brânquias estão expostas ao meio ambiente, a ação da insulina sobre o metabolismo dos aminoácidos nas brânquias posteriores pode ser importante na adaptação desse animal ao habitat estuarino. Em *C. granulata* a participação da via gliconeogênica hepatopancreática no ajuste metabólico do repositório de aminoácidos durante o estresse

hiposmótico foi demonstrada por OLIVEIRA e Da Silva (2000). A ação deste hormônio na captação de aminoácidos pode ocorrer durante a adaptação ao estresse hiperosmótico quando é necessário aumentar a concentração de aminoácidos livres intracelular para regular o volume celular. SCHEIN e cols. (2003) constataram uma diminuição significativa da concentração de glicina na hemolinfa de *C. granulata* após estresse hiperosmótico. O sistema de transporte de glicina é o A, que é sódio dependente e sensível a ação de insulina. Além disso, a glicina é um aminoácido não perturbador, pois não causa qualquer alteração na atividade enzimática intracelular, sendo considerada, por isto, um excelente osmólito (YANCEY e cols., 1982). Recentemente, em brânquias do molusco bivalve *Geukensia demissa* foi constatado acúmulo intracelular de alanina e glicina após o choque hiperosmótico (DEATON, 2001).

Não foi constatado efeito da insulina suína sobre a captação de ^{14}C -AIB em brânquias anteriores e músculo. Da mesma forma, KUCHARSKI e cols. (2002) não constataram efeito de insulina suína sobre a captação de glicose e a síntese de glicogênio em brânquias anteriores. Estes resultados corroboram com a hipótese da participação da insulina no processo de osmorregulação, pois as brânquias posteriores têm a função de osmorregulação e as anteriores respiratória (PEQUEUX, 1995). Entretanto, a presença de receptores para insulina em brânquias anteriores foi verificada por KUCHARSKI e cols. (1997), contudo, o seu papel ainda não foi esclarecido.

Em seu artigo de revisão CIAFFI (1984) mostrou possuírem as brânquias de caranguejos um epitélio simples, que separa a água do meio e da hemolinfa, constituído por 2 tipos celulares: células finas, com provável função na troca de gases, predominantes nas

brânquias anteriores e células mais espessas, com extensos pregueamentos apicais e basolaterais, encontradas no interior das lamelas das brânquias posteriores.

WELCOME & DEVOS (1991) verificaram que as brânquias posteriores do caranguejo *Eriocheir sinensis* mostraram um epitélio do tipo transportador enquanto que as anteriores apresentaram um epitélio tipo respiratório. Estudos com homogeneizado de brânquias posteriores mostram uma atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores 14 vezes maior do que nas anteriores (TOWLE & KAYS, 1986). Em *C. granulata* a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores é cerca de 1,5 vezes maior que nas anteriores. CASTILHO e cols. (2001) em *C. granulata* adaptados à salinidade de 2‰ constataram também uma diferença de cerca 1,5 vez na atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ entre as brânquias posteriores e anteriores. Entretanto, os valores basais obtidos pelos autores foram mais elevados que os verificados no presente trabalho, talvez devido ao tempo (30 dias) e a salinidade (2‰) da aclimação dos caranguejos. Muitos relatos têm demonstrado que a atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores é sensível a mudanças de salinidade (NEUFELD et al., 1980; HENRY & CAMERON, 1982; HOLLIDAY, 1988; KAMEMOTO, 1991; COROTTO & HOLLIDAY, 1996). A exposição à baixa salinidade parece causar uma elevação na atividade das enzimas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e anidrase carbônica, principalmente nas brânquias posteriores e em alguma extensão nas anteriores (TOWLE et al., 1976; NEUFELD et al., 1980; HENRY & CAMERON, 1982; SAVAGE & ROBINSON, 1983; HENRY, 1988a).

Os resultados do presente trabalho mostram que ocorre um aumento significativo na atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias posteriores dos caranguejos que receberam

tratamento insulínico durante 8 dias. Em mamíferos diversos trabalhos têm demonstrado a ação das catecolaminas, hormônios da tireóide, do crescimento (GH), cortisol, IGF-I e insulina sobre a atividade desta ATPase (SWEENEY & KLIP, 1998; EWART & KLIP, 1995). Em brânquias de peixes teleósteos e salmonídeos os efeitos dos hormônios do GH e IGF-I sobre a atividade e expressão da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias e outros tecidos envolvidos no processo de osmorregulação em peixes têm sido bastante investigados (MANCERA & McCORMICK, 1998; SEIDELIN e cols., 1999; LÓPEZ e cols., 2002). Estes trabalhos demonstram que tanto o IGF-I sozinho como a combinação de GH/IGF-I aumenta a atividade e a expressão da enzima em brânquias de peixe. Em crustáceos não foi encontrado nenhum trabalho na literatura consultada que demonstrasse a ação da insulina ou IGF-I sobre a atividade dessa ATPase. Os trabalhos em crustáceos tratam mais do efeito da salinidade sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias posteriores e anteriores e sua participação no processo de osmorregulação (HOLLIDAY, 1988; HARRIS & BAYLISS, 1988; LUCU & DEVESCOVI, 1999; CASTILHO e cols., 2001).

A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ realiza a transferência de 3 Na^+ intracelulares em troca de 2 K^+ extracelulares por molécula de ATP hidrolisada. Esta diferença no movimento de cátions através da membrana resulta em um aumento da negatividade em alguns milivolts no potencial de membrana. A bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ tem distribuição ubíqua nas células eucarióticas. A atividade desta enzima contribui, também, para o controle de pH celular, balanço osmótico, volume celular, assim como, no transporte de nutrientes como aminoácidos, vitaminas e glicose (intestino e rim de mamíferos) (SWEENEY & KLIP, 1998).

O *C. granulata* é um caranguejo estuarino que mantém as concentrações osmótica e iônica da hemolinfa mais ou menos independente do meio. Como outros caranguejos ele é dependente da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ branquial para o transporte ativo de sal, de maneira a manter uma hemolinfa hiperosmótica em meio diluído (CASTILHO e cols., 2001). Quando este caranguejo é submetido ao estresse hiposmótico 2‰ a atividade desta enzima aumenta significativamente tanto nas brânquias anteriores como nas posteriores, contudo, a maior atividade é constatada nas brânquias posteriores (CASTILHO e cols., 2001). Talvez o fornecimento de ATP para a manutenção da atividade enzimática seja oriundo do glicogênio armazenado nesse órgão, pois em *C. granulata* a concentração de glicogênio nas brânquias é cerca de 2 vezes maior que no hepatopâncreas e músculo, porém nas brânquias posteriores a concentração desse polissacarídeo é significativamente maior que nas anteriores (CHITTÓ e cols., 2000). Em *C. granulata* a incubação das brânquias posteriores com insulina bovina, estimula a captação de glicose e síntese de glicogênio neste tecido, contudo, o mesmo efeito não é constatado nas brânquias anteriores (KUCHARSKI e cols., 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a insulina além de um efeito metabólico em brânquias posteriores também possui um efeito sobre a osmorregulação, aumentando a atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e a captação de aminoácidos. Talvez o efeito sobre o metabolismo de carboidratos constatado por KUCHARSKI e cols. (2002) ocorreria após o processo de adaptação osmótica com o objetivo de repor as reservas energéticas utilizadas durante o processo de adaptação à nova salinidade. Nos caranguejos *Eriocheir sinenses* e *C. granulata* ocorre uma redução da concentração de glicogênio nas

brânquias posterior durante o processo de adaptação osmótica (WELCOMME & DEVOS, 1991; CHITTÓ e cols., 2000).

Em *C. granulata* os aminoácidos com maior concentração na hemolinfa são glicina, alanina, prolina, serina e arginina, sendo a glicina e a alanina os que diminuem sua concentração durante o processo de adaptação ao estresse hiperosmótico (SCHEIN e cols., 2003). Estes dois aminoácidos utilizam o sistema de transporte A dependente de Na^+ e estimulado pela insulina em vertebrados. É válido sugerir que em *C. granulata* o envolvimento da insulina no processo de osmorregulação ocorra aumentando a atividade da enzima $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ em brânquias posteriores e a captação de aminoácidos durante a adaptação a meio hiperosmóticos. Estudos para a determinação da captação de aminoácidos e proteólise com experimentos submetendo os tecidos ao estresse hierosmótico *in vitro*, na presença e na ausência de insulina, serão esclarecedores.

O papel da insulina/IGF-I em invertebrados é pouco conhecido, contudo, os resultados obtidos neste trabalho e em outros da literatura sugerem para este hormônio um efeito pleitrópico com funções tanto de insulina como de IGF-I (CHAN & STEINER, 2000). O presente trabalho contribuiu para esclarecer o papel desse hormônio no processo de osmorregulação. Através das técnicas de biologia molecular poderemos verificar se a insulina também aumenta a expressão da $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ em *C. granulata* como ocorre em vertebrados (SWEENEY & KLIP, 1998).

BIBLIOGRAFIA

- AHEARN, G.A. et al. Alanine transport by lobster hepatopancreatic cell suspensions. *Reg. Integr. Comp. Physiol.*, 13R:150-162, 1983.
- ALDRIDGE, J.B. & CAMERON, J.N. Gill morphometry in the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun (Decapoda Brachyura). *Crustaceana*, 43:297-305, 1982.
- ALDRIDGE, J.B. (1977). Structure and respiratory function in the gill of the blue crab *Callinectes sapidus* (Rathbun). M. A. Thesis, University of Texas, Austin, Texas, U.S.A., 1977.
- AUGUSTO, A.S. **A regulação isosmótica intracelular em estágios ontogenéticos selecionados do camarão de água doce *Macrobrachium offensii* (Crustacea, Decápoda)**. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000. 76 p. Dissertação de Mestrado.
- BAGINSKI, R.M. & PIERCE Jr., S.K., The time course of intracellular free amino acid accumulation in tissue of *Modiolus demissus* during high salinity adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57A:407-412, 1977.
- BARRA, D.J. & HUMBERT, W. A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. *Tissue and Cell*, 15:583-596, 1983.
- BIANCHINI, A. & GILLES, R. Cyclic AMP as a modulator of NaCl transport in gills of the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Mar. Biol.*, 104:191-195, 1990.
- BISBAL, G.A. & Specker, J.L. Cortisol stimulates hypo-osmoregulation ability in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Biol.*, 39:421-432, 1991.
- BISHOP, S.H. & BURTON, R.S. Amino acid synthesis during hyperosmotic stress in *Penaeus aztecus* postlarvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A(1):49-56, 1993.
- BISHOP, S.H. et al. Metabolic regulation of proline, glycine and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. *J. Exp. Zool.*, 268:151-161, 1994.
- BLANCO, G. & MERCER, R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: Heterogeneity in structure , diversity in function. *Am. J. Physiol.*, 275:F633-F650, 1998.

-
- BOEUF, G.; PRUNET, P. & LE BAIL, P.Y. Is growth hormone treatment able to stimulate the smoltification in the Atlantic salmon? *C. R. Acad. Sci.*, 310:75-80, 1990.
- BOSCHI, E.E. Los crustaceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. *Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata)*, 6:1-76, 1964.
- BOTTO, J.L. & IRIGOYEN, H.P. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. Contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del Río Salado, provincia de Buenos Aires. **In:** *Sem. Latinoam. Ecol. Bentónica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlantico Sur*. UNESCO, Montevideo, 1980. p.161-169.
- BRADFORD, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein - Dye Binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- BRIGGS, A.P. et al. Some changes in the composition of blood due to injection of insulin. *J. Biol. Chem.*, 58:721-730, 1924.
- BROMBERG, E. **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hiper e hiposmótico no inverno e verão.** Fundação Universidade de Rio Grande - FURG, Rio Grande, 1992. Dissertação de Pós-Graduação.
- CASTILHO, P.C.; MARTINS, I.A. & BIANCHINI, A. Gill Na⁺, K⁺-ATPas and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 256:215-227, 2001.
- CHAN, K.M.; DELFERT, D; & JUNGER, K.D. A Direct Colorimetric Assay for Ca²⁺-Stimulated ATPase Activity. *Anal. Biochem.*, 157:375-380, 1986.
- CHAN, SJ, & STEINER, DF. Insulin through the ages: phylogeny of a growth promoting and metabolic regulatory hormone. *Amer. Zool.*, 40: 213-222, 2000.
- CHANG, E. & O'CONNOR, JD. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. **In:** BLISS, D.E. **The Biology of Crustacea**. Academic Press, New York, 1983. p. 263-289.
- CHANG, E.S., TAMONE, S.L., LIN, W.W. & OBERBAUER, A.M. Modifications to the paradigm OF THE HORMONAL CONTRL OF CRUSTACEANS MOLTING: Effects of metabolic inhibitors on the ecdysiotrophic action of methyl farnesoate and evidence for na insulin-like growth factor. **In Proceeding**

-
- of the **International Symposium on Biotechnology Applications in Aquaculture**. Asian fisheries Society Special Publication 10, 1995. p 183-195.
- CHUANG, NN., & WANG, PC. Characterization of phosphotyrosyl protein phosphatase from the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *J. Exp. Zool.*, 266: 181-187, 1993.
- CIAFFI, M. Comparative ultrastructure of arthropod transporting epithelia. *Am. Zool.*, 24:139-156, 1984.
- COPELAND, D.E. Fine structure of salt and water uptake in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *Am. Zoologist.*, 8:417-532, 1968.
- COPELAND, D.E. & FITZGARREL, A.T. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 92:1-22, 1968.
- COPELAND, D.E., Salt absorbing cells in the gills of crabs, *Callinectes* and *Carcinus*. *Biol. Bull.*, 127:367, 1964.
- COROTTO, F.S. & HOLLIDAY, C.W. Branchial Na, K-ATPase and osmoregulation in the purple shore crab, *Hemigrapsus nudus* (Dana). *Comp. Biochem. Physiol.*, 113A:361-368, 1996.
- CROGHAN, P. C. The osmotic and ionic regulation of *Artemia salina* (L.). *J. of Exp. Biol.*, 35:219-233, 1958.
- CROGHAN, P.C. The survival of *Artemia salina* (L.) in various media. *J. of Exp. Biol.*, 35:213-218, 1958.
- DA SILVA RSM, & KUCHARSKI LCR. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A: 631-634, 1992.
- DEATON E.D. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid accumulation of betaine and alanine. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 260: 185-197, 2001.
- DEHNEL, P.A. Gill tissue respiration in the crab *Eriocheir sinensis*. *Canadian Journal of Zoology*, 52:923-937, 1974.

-
- DRACHT, F & TCHERNIGOVITZEFF, C. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application générale aux crustaces. *Vie Mieu*, 161:595-607, 1967.
- DRAGOLOVICH, J. & PIERCE, S.K. Comparative time courses of inorganic and organic osmolyte accumulation as horseshoe crabs (*Limulus polyphenus*) adapt to high salinity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A(1):79-84, 1992.
- EAKLE, K.A.; Lyu, R.M.; FARLEY, R.A. The influence of beta subunit structure on the interaction of Na⁺/K⁺-ATPase complexes with Na⁺. A chimeric beta subunit reduces the Na⁺ dependence of phosphoenzyme formation from ATP. *J. Biol. Chem.*, 270:13937-13947, 1995.
- EICHLER, P. **Transporte de glicose e de aminoácidos nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus ganulata* (Dana, 1851).** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS, Porto Alegre, 2001. Dissertação de Mestrado.
- EPPLE A., & BRINN J.E. The comparative physiology of the pancreatic islets. In D:S: Farmer (ed) **Zoophysiology, vol. 21.** Springer-Verlag, New York. pp. 9-122, 1987.
- ESMANN, M. ATPase and phosphatase activity of Na⁺, K⁺-ATPase:molar and specific activity, protein determination. *Methods Enzymol.* 156: 105-115, 1988.
- EWART, H.S. & KLIP, A. Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: Mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am. J. Physiol.*, 268:C295-C311, 1995.
- FAMBROUGH, D.M. et al. Analysis of subunit assembly of the Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.*, 266:C579-589, 1994.
- FAUTH, M.G., MACHADO, V.L.A. & WASSERMANN, G.F. Insulin action on amino acid uptake by rat adrenal glands *in vitro*. *Med. Sciences Res.*, 17:675-676, 1989.
- FINGERMAN, M., NAGABHUSHANAN, R., & SAROJINI, R. Vertebrate-type hormones in crustaceans : Localization, identification and functional significance. *Zool. Sci.* 10: 13-29, 1993.
- FLIK, G. & LUCU, C. Na⁺ pump and Ca²⁺ exchange activity in gills of hyperregulation shore crab. *The Society for Experimental Biology Annual Meeting - Abstract*, 1999.

- FREIRE, C.A., McNAMARA, J.C. & ROSA, J.C. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). Free amino-acid concentrations in the hemolymph. *Gen. Comp. Endocr.*, 100(1):83-91, 1995.
- GEERING, K. Subunit assembly and functional maturation of Na, K-ATPase. *J. Membr. Biol.*, 115:109-121, 1990.
- GEERING, K. et al. Oligomerization and mutaration of Na, K-ATPase: Functional interaction of cytoplasmic NH₂ terminus of the β subunit with the α subunit. *J. Cell Biol.*, 133:1193-1204, 1996.
- GILLES, R. "Compensatory" organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: History and perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117A:279-290, 1997.
- GILLES, R. Osmoregulatory process in mollusc and crustacean from media with fluctuating salinity regime. *Bol. Fisiol. Animal USP*, 6:1-36, 1982.
- GILLES, R. & DELPIRE, E. Variations in salinity, osmolarity and water availability: Vertebrates and invertebrates. In: DANTZELER, W.H. (ed.). **Handbook of Comparative Physiology**. Oxford University Press, New York, 1997. p. 1523-1586.
- GILLES, R. & PEQUEUX, A. Ion transport in crustacean gills. In: GILLES, R. & GILLES-BAILLEN, M. **Transport Process, Iono and Osmoregulation. Current Comparative Approaches**. Springer-Verlag, Berlin, 1985. p. 136-158.
- HAGAR, SR, & BITTAR, EE. Hormones and the barnacle muscle fiber as a preparation. *Comp. Biochem. Physiol.* 81: 247-252, 1985.
- HART, C. et al. Frog brain and liver show evolutionary conservation of tissue specific differences among insulin receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 68:170-178, 1987.
- HENRY, R.P. The subcellular distribution of carbonic anhydrase activity in the gills of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.*, 245:1-8, 1988.
- HENRY, R.P. & CAMERON, J.N. Acid-base balance in *Callinectes sapidus* during acclimation from high to low salinity. *J. of Exp. Biol.*, 101:225-264, 1982.
- HERREID, C.F. & FULL, R.J. Energetics and locomotion. In: MACMAHON, B. **Biology of Land Crabs**. Cambridge University Press, Cambridge, 1988. p. 337-377.

-
- HOAR, W.S. The physiology of smolting salmonids. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D. (ed.) **Fish Physiology**. Vol. XIB. Academic Press, New York, 1988. p. 275-283.
- HOLLIDAY, C.W. Branchial Na^+/K^+ -ATPase and osmoregulation in the isopod, *Idotea wosnesenskii*. *J. of Exp. Biol.*, 136:259-272, 1988.
- HOLLIDAY, C.W. Salinity-induced changes in gill Na, K-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. *J. Exp. Zool.*, 233:199-208, 1985.
- HUNDAL, H.S. et al. Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na^+/K^+ -ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 267:5040-5043, 1992.
- HUNDAL, H.S. et al. Subcellular distribution and immunocytochemical localization of Na, K-ATPase subunit isoforms in human skeletal muscle. *Mol. Mem. Biol.*, 116:225-262, 1994.
- INUI Y., & GORBMAN, A. Role of liver in regulation of carbohydrate-metabolism in hagfish, *Eptatretus stouti*. *Comp. Biochem. Physiol.* 60A: 182-183, 1978.
- JONAS E.A., KNOX R.J., KACZMAREK L.K., SCHWARTZ J.H., & SOLOMON D.H. Insulin receptor in *Aplysia* neurons: Characterization, molecular cloning, and modulation of ion current. *J. Neurosci.* 16: 1645-165, 1996.
- KAMEMOTO, F.I. Crustacean neuropeptides and osmoregulation. **In:** FARMER, D.S. & LEDERIS, K. **Neurosecretion: Molecules, Cells, Systems**. Plenum, New York, 1982. p.329-335.
- KAMEMOTO, F.I. Neuroendocrinology of osmoregulation in crabs. *Zool. Sci.*, 8:827-833, 1991.
- KAMEMOTO, F.I. & OYAMA, S.N. Neuroendocrine influence on effector tissues of hydromineral balance in crustacean. **In:** LOFTS, B. Proc. 9th Int. Symp. Comp. Endocrinol. Hong-Kong University Press, Hong-Kong, 1985. p. 883-886.
- KARNAKY, K.J. et al. Teleost chloride cell. II. Autoradiographic localization of gill Na, K-ATPase in killifish, *Fundulus heteroclitus*, adapted to low and high salinity environments. *J. Cell Biol.*, 70:157-177, 1976.

-
- KOCH, H.J. Cholinesterase and active transport of sodium chloride through the isolated gills of the crab *Eriocheir sinensis* (M. Edw.) - **In: KITCHING, J.A. Recent developments in cell physiology.** Butterworths, London, 1954. p. 15-27.
- KOCH, H.J.; EVANS, J. & SCHICKS, E. The active absorption of ions by the isolated gills of the crab *Eriocheir sinensis* (M. Edw.). *Mededelingen van Koninklijke Vlaamse Akademie voor Wetens Chappen*, 16:1-16, 1954.
- KOENING, M.L. Aspects of glycine metabolism in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*) acutely exposed to hypersaline conditions. Texas A & M University, 1981. M.S. Thesis.
- KUCHARSKI, L.C.R. **Insulina: presença de receptores e efeito biológico em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata*.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, 1997. Tese de Doutorado.
- KUCHARSKI, L.C.R. et al. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *J. Exp. Zool.*, 279:118-125, 1997.
- KUCHARSKI, L.C.R. et al. Insulin signaling: tyrosine kinase activity in the crab *Chasmagnathus granulata* gills. *J. Exp. Zool.*, 283(1):91-94, 1999.
- 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.* 125: 256-263, 2002.
- LEVENSON, R. Isoforms of the Na, K-ATPase: Family members in search of function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharm.*, 123:1-45, 1994.
- LOHRMANN, D.M. & KAMEMOTO, F.I. The effect of dibutyl CAMP on sodium uptake by isolated perfused gills of *Callinectes sapidus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 65:300-305, 1987.
- LUCU, C. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. *Comp. Biochem. Physiol.*, 97A:297-306, 1990.
- LYNDON, A.R. & HOULIHAN, D.F. Gill protein turnover: costs of adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119(1):27-34, 1998.

-
- LYTTON, J.; LIN, J.C.; GUIDOTTI, G. Identification of two molecular forms of (Na⁺, K⁺)-ATPase in rat adipocytes: relation to insulin stimulation of the enzymes. *J. Biol. Chem.*, 260:1177-1184, 1985.
- MALIK, N. et al. Identification of the mammalian Na, K-ATPase β 3 subunit. *J. Biol. Chem.*, 271:22754-22758, 1996.
- MANCERA J.M., & MCCORMICK S.D. Evidence for growth hormone insulin-like growth factor I axis regulation of seawater acclimation in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111: 103-112, 1998.
- MAÑE-GARZON, F. et al. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulación frente a cambios de la salinidad. *Physis, Sección A*, 33(86):163-263, 1974.
- MANTEL, L.H. The foregut of *Gecarcinus lateralis* as an organ of salt and water balance. *American Zoologist*, 8:433-442, 1968.
- MANTEL, L.H. & FARMER, L.L. Osmotic and ionic regulation. **In:** MANTEL, L.H. **The Biology of Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation.** Vol.5. Academic Press, New York, 1983. p. 53-161.
- MANTEL, L.H. & OLSON, J.R. Studies on the Na⁺-K⁺-activated ATPase of crab gills. *Am. Zool.*, 16:223, 1976.
- MANTEL, L.J. & LANDESMAN, J. Osmotic regulation and Na-K-activated ATPase in the green crab, *Carcinus maenas* and the spider crab, *Libinia emarginata*. *Bio.Bull.*, 153:437-438, 1977.
- MARQUES, M. & FALKMER, S. Effects of mammalian insulin on blood glucose level, glucose tolerance, glycogen content on musculature and hepatopancreas in gastropod mollusc, *Strophocheilus oblongus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29:522-530.
- MARQUES, M. et al. *In vivo* specific uptake of labeled insulin by liver, adipose tissue, pituitary, and adrenals in the turtle *Chrysemys dorsibigni*. *Gen. Com. Endocrinol.*, 48:89-97, 1984.
- MATSUSHIMA, O. & HAYASHI, Y.S. Metabolism of D and L-alanine and regulation of intracellular free amino acids levels during salinity stress in brackish-water bivalve *Corbicula japonica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A:465-471, 1992.

- McCORMICK, S.D. Hormonal control of gill Na^+ , K^+ -ATPase and chloride cell function. **In:** WOOD, C.M.; SHUTTLEWORTH, T.J. (ed.). *Fish Physiology - Iono-regulation: Cellular and Molecular Approaches*. Vol. XIV. Academic Press, New York, 1995.
- McCORMICK, S.D. & SAUNDERS, R.L. Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: Osmoregulation growth and metabolism. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 1:211-229, 1987.
- McDONOUGH, A.A.; GEERING, K. & FARLEY, R.A. The sodium pump needs its β subunit. *FASEB J.*, 4:1598-1605, 1990.
- McGILL, D.L. & GUIDOTTI, G. Insulin stimulates both the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ isoforms of the rat adipocyte (Na^+ , K^+) ATPase: two mechanisms of stimulation. *J. Biol. Chem.*, 266:15824-15831, 1991.
- MCNAMARA J.C., & TORRES A.H. Ultracytochemical location of Na^+/K^+ -ATPase activity and effect of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Zool.* 284: 617-628, 1999.
- McWHINNIE, M.A. Gastrolith growth and calcium shifts in the freshwater crayfish, *Orconectes virilis*. *Com. Biochem. Physiol.*, 7:1-14, 1962.
- MORENO, J.A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Secretaria de Agricultura do Estado do Rio Grande do Sul, Diretoria de Teras e Colonização, Seção de Geografia, Porto Alegre, 1961.
- MORRIS, S.; AIRRIERS, C.N. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. *S. Afr. J. Zool.*, 33:87-106, 1998.
- NEUFELD, G.J. & PRITCHARD, J.B. Osmoregulation and gill Na , K - ATPase in the rock crab, *Cancer irroratus*: Response to DDT. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62C:165-172, 1979.
- NEUFELD, G.J.; HOLLIDAY, C.W. & PRITCHARD, J.B. Salinity adaptation of till Na , K -ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. of Exp. Zool.*, 211:215-224, 1980.
- OKUMA, E. & ABE, H. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A(1): 191-197, 1994.
- OLIVEIRA, G.T. Metabolismo de carboidratos em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas e submetidos a diferentes períodos de anorexia ambiental e de recuperação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998. Tese de Doutorado.

- OLIVEIRA, G.T. & DA SILVA, R.S.M. Hepatopâncreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 127:375-381, 2000.
- OLIVEIRA G.T., ROSSI I.C., & DA SILVA R.S.M. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.* 139: 335-342, 2001.
- PEQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.*, 15:1-60, 1995.
- PEQUEUX, A. & BARRA, J.A. Fine structure of the gill epithelium of the euryhaline crab *Eriocheir sinensis* as a function of the salinity of the acclimation medium. *European Journal of Cell Biology*, 22:470, 1980.
- PEQUEUX, A. & GILLES, R. Osmoregulation of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis* as related to the activity of (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, 85:426-428, 1977.
- PEQUEUX, A. & GILLES, R. Transepithelial potential difference of isolated perfused gill of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*, acclimated to fresh water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 89:162-172, 1988.
- PEQUEUX, A. et al. Kinetic characteristics and specific activity of gill (Na⁺+K⁺) ATPase in the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis* during salinity acclimation. *Mar. Biol. Letters*, 5:35-45, 1984.
- PETRUZZELLI L., HERRERA R., ARENASGARCIA R., FERNANDEZ R., BIRNBAUM M.J., & ROSEN O.M. Isolation of a *Drosophila* genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin-receptor and detection of the phosphorylated *drosophila* receptor with an antipeptide antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4710-4714, 1986.
- PRESTON, R.L. Transport of amino acids by marine invertebrates. *J. Exp. Biol.*, 265:410-421, 1993.
- PETRUZZELLI, L. et al.. Isolation of a *Drosophila* genomic sequence homologous to the kinase domain of the human insulin receptor and detection of the phosphorylated *Drosophila* receptor with an anti-peptide antibody. *Proc. Nat. Acad. of Sci. USA*, 83: 4710-4714, 1984.
- PLISETSKAYA E., BHATTACHARYA S., DICKHOFF W.W., & GORBMAN A. The effect of insulin on amino-acid-metabolism and glycogen-content in isolated liver-cells of juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Comp. Biochem. Physiol.* 78A: 773-778, 1984.

-
- PROSSER, C.L. Water: osmotic; hormonal regulation. **In:** PROSSER, C.L. **Comparative animal physiology**. W. B. Saunders, Philadelphia, 1973. p. 1-78.
- QUINN, D.J. & LANE, C.E. Ionic regulation and Na⁺K⁺ stimulated ATPase activity in the land crab, *Cardisoma guanhumi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 19:533-543, 1966.
- RATHBUN, M.J. The grapsoid crabs of America. *Smithsonian Institution, Bull. U.S. Nat. Mus.*, 97:97-445, 1918.
- RICHARDSON, NA, ANDERSON, AJ, & SARA, VR. The effects of insulin/IGF-I on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 105: 287-292, 1997.
- ROBERTSON, J.D.; COWEY, C.B. & LEAF, G. The free amino acids in muscle as three marine invertebrate *Nephrops novergicus* (L.), *Limulus polyphemus* (L.) and *Eledone cirrhosa* (Lamarck). *Comp. Biochem. Physiol.*, 101A(3):545-548, 1992.
- ROTHE H., LUSCHEN W., ASKEN A., WILLIG A., & JAROS P.P. Purified crustacean enkephalin inhibits release of hyperglycemic hormone in the crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 99C: 57-62, 1991.
- ROSAS, C. et al. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: Effect of salinity and dietary carbohydrate levels. *J. Exp. Mar. Biol. and Ecol.*, 259(1):1-22, 2001.
- SANDERS, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . II. Insulin-like biological activity. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 50:374-377, 1983b.
- SANDERS, B. Insulin-like peptides in the lobster *Homarus americanus* . III. No glucostatic role. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 50: 378-382, 1983c.
- SANTOS, E.A. & NERY, L.G.M. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A(4):1033-1035, 1987.
- SAVAGE, J.P. & ROBINSON, G.D. Inducement of increased gill Na/K-ATPase activity by a hemolymph factor in hyperosmoregulating *Callinectes sapidus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75A:65-69, 1983.

- SCHEIN, V. Efeito da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - UFRGS, Porto Alegre, 1999. Dissertação de Mestrado.
- SCHEIN V., OLIVEIRA E.B., KUCHARSKI LCR, & DA SILVA R.S.M. Effect of hyperosmotic stress on hemolymph amino acids concentration and protein synthesis in tissues from crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Mar. Biol.* In press, 2003.
- SEIDELIN, M. & MADSEN, S.S. Endocrine control of Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell development in brown trout (*Salmo trutta*): interaction of insulin-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. *J. Endocrinol.*, 162:127-135, 1999.
- SEIDELIN, M. & MADSEN, S.S. Prolactin antagonizes the seawater-adaptive effect of cortisol and growth hormone in anadromous brown trout (*Salmo trutta*). *Zool. Science*, 14:249-256, 1997.
- SEIDELIN, M.; MADSEN, S.S. & NIELSEN, J.A. Additive effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I in promoting seawater tolerance in brown trout (*Salmo trutta*). **In:** KAWASHIMA, S. & KIKUYAMA, S. (ed.). **Advances in Comparative Endocrinology**. Proc. to the XIIIth International Congress of Comparative Endocrinology. Monduzi Editore S.p.A., Bologna, Italy, 1997. p. 1133-1137.
- SEGAL S., ROTH H., BLAIR A., & BERTOLI D. Accumulation of amino acids by thyroid gland slices. *Endocrinol.* 79: 675, 1966.
- SHEMER, J.; RAIZADA, M. & LeROITH, D. Structural and functional studies on insulin receptors from alligator brain and liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85:1-10, 1987.
- SHOTWELL, M.A. et al. Neutral amino acid transport system in Chinese hamsters ovary cells. *J. Biol. Chem.*, 256:5422-5427, 1981.
- SIEBERS, D. et al. NA-K ATPase generates an active transport potential in the gills of the hyperregulating shore crab *Carcinus maenas*. *Mar. Biol.*, 87:185-192, 1985.
- SIMON, J. & LeROITH, D. Insulin receptors in chicken liver and brain. Characterization of alpha and beta-subunit properties. *Eur. J. Biochem.*, 158:125-132, 1986.

-
- SOMMER, M.J. & MANTEL, L.H. Effect of dopamine, cyclic AMP and pericardial organs on sodium uptake and Na/K-ATPase activity in gills of the green crab *Carcinus maenas* (L.). *J. of Exp. Zool.*, 248:272-277, 1988.
- SOMMER, M.J. & MANTEL, L.H. Effects of dopamine and acclimation to reduced salinity on the concentration of cyclic AMP in the gills of the green crab *Carcinus maenas* (L.). *General and Comparative Endocrinology*, 82:364-368, 1991.
- SPENCER, A.M.; FIELDING, A.H. & KAMEMOTO, F.I. The relationship between gill Na, K-ATPase activity and osmoregulatory capacity in various crabs. *Physiol. Zool.*, 52:1-10, 1979.
- STANGIER, J. et al. Unusual cardioactive peptide (CCAP) from the pericardial organs of the shore crab *Carcinus maenas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:575-579, 1987.
- STANGIER, J., DIRECKSEN, H. & KELLER, R. Identification and immunocytochemical localization of proctolin in the pericardial organs of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Peptides*, 7:67-72, 1986.
- SURECH, N.; SHIRAKUMAR, K. & JAYARAMAN, J. The adaptation to salinity: protein synthesis and some aspects of energy transduction in fish gill mitochondria. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 15:379-394, 1983.
- SWEENEY, G. & KLIP, A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: Why and how? *Mol. Cel. Biochem.*, 182:121-133, 1998.
- TAM, C.H. & CHOONG, K.Y. Effect of hyperosmotic stress on hemolymph protein, muscle nihydrin-positive substances and free amino acids in *Macrobrachium resenbergi* (De Man). *Comp. Biochem. Physiol.*, 70A:485-489, 1981.
- TAYLOR, H.H. & TAYLOR, E.W. Gills and lungs: the exchange of gasses and ions. **In:** HARRISON, F.W. *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Decapoda Crustacea*. A. R. Liss, New York, 1992. p. 203-293.
- TESSARI, P. Effects of insulin on whole-body and regional amino acid metabolism. *Diabetes Metab. Rev.*, 10:253-285, 1994.
- THERIEN, A.G. & Blostein, R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol.*, 279:C541-C566, 2000.
- THORPE, A., & DUVE, D. Insulin and glucagon-like peptides in Insects and Molluscs. *Mol. Physiol.*, 5: 235-260, 1984.

-
- TIPSMARK, C.K. & MADSEN, S.S. Rapid modulation of Na⁺, K⁺-ATPase activity in gill and kidney of a euryhaline teleost. ISFE W-902, Abstract, 2000.
- TOWLE, D.W. Membrane - bound ATPase in arthropod ion-transporting tissues. *Amer. Zool.*, 24:177-185, 1984.
- TOWLE, D.W. Transport-related ATPase as probes of tissue function in three terrestrial crabs of Palau. *J. Exp. Zool.*, 218:89-95, 1981.
- TOWLE, D.W. & KAYS, W.T. Basolateral localization of Na⁺-K⁺-ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.*, 230:311-318, 1986.
- TRAUSCH, G.; FORGET, M.C. & DEVOS, P. Bioamine-stimulated phosphorylation and (Na⁺,K⁺)-ATPase in the gills of the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94B:487-492, 1989.
- VINAGRE, AS. & DA SILVA, RSM. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Can. J. Zool.*, 80: 1413-1421, 2002.
- WELCOME, L. & DEVOS, P. Immunological Identification and Biochemical Characterization of a Glucose Transporter in the Posterior Gill of the Crab *Carcinus maenas* (L.). *J. Exp. Zool.*, 268:218-223, 1994.
- YAMAGUCHI T, FERNANDEZ R., & ROTH RA Comparison of the signaling abilities of the drosophila and human insulin receptors in mammalian cells. *Biochemistry*, 34: 4962-4968, 1995.
- YANCEY P.H., CLARK M.E., HAND H.C., BOWLUS R.D., & SOMERO G.N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1224-1222, 1982.
- ZIERLER, K. & WU, F.S. Insulin acts on Na⁺, K⁺, and Ca⁺⁺ currents. *Trans. Assoc. Am. Phys.*, 101:320-325, 1988.