

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

**ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE GLICONEOGÊNICA DA
ARANHA CARANGUEJEIRA (*Grammostola sp* – Mygalomorphae)
DURANTE O INVERNO E O VERÃO**

Dissertação de Mestrado

ROGÉRIO DANIEL PORCHER

Porto Alegre, Janeiro de 2005

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

ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE GLICONEOGÊNICA DA ARANHA
CARANGUEJEIRA (*Grammostola sp* – Mygalomorphae) DURANTE O INVERNO E
O VERÃO

ROGÉRIO DANIEL PORCHER

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Kucharski

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

Porto Alegre, Janeiro de 2005

Dedico este trabalho

à Carina.

AGRADECIMENTOS

À meus pais Cláudio e Dalva.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Carlos R. Kucharski, com admiração, pelo profissionalismo e amizade, pela dedicação e paciência.

À Profa. Dra. Roselis S. M. da Silva responsável pelo laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada.

Ao Prof. Lino Pinto de Oliveira Júnior pela amizade e pelo endosso a minha qualificação acadêmica.

Aos Amigos Professores Dr. André Jasper, Ms. Hamilton Cezar Zanardi Grillo e Ms. Raul Stoll.

À amiga Carmem Bock.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada: Mere, Gabriela, Márcia, Ana, Vanessa, Alessandra, Letícia, Ubirajara, Matheus, José Eduardo, Sandra, Felipe, Alan, Ricardo, Glauco, Fabiana, Lucia, Danielle e Luciana, pela amizade e paciência.

Aos professores do Departamento de Fisiologia que com competência profissional e saber admirável participaram na minha formação em especial aos Professores Dr. Edison Capp, Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Junior e a Dra. Wânia Aparecida Partata.

Às secretárias do PPG-Fisiologia Uiraçara e Ana pelo auxílio. Em especial a Mírian e a Alice pelo inestimável carinho.

Ao Centro Universitário UNIVATES que através de seu Reitor e Pró Reitores, Diretores e Coordenadores viabilizaram todas as condições possíveis para a realização deste curso de pós-graduação.

Ao Museu de Ciências Naturais da UNIVATES pela cedência de espaço físico, pelo agradável ambiente de trabalho e pelo apoio ao desenvolvimento de nossos projetos.

Ao professor Rogeris Luz Mossman.

Ao CNPq a FAPERGS e a UNIVATES pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO GERAL	4
JUSTIFICATIVA	13
OBJETIVOS	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS	15
CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE DE COLETA	22
<i>Geomorfologia</i>	22
<i>Vegetação</i>	23
<i>Clima</i>	24
<i>Morfologia</i>	26
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	27
DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	27
<i>Determinação da concentração de glicose na hemolinfa</i>	27
<i>Isolamento e determinação de glicogênio</i>	28
<i>Estudo da atividade gliconeogênica</i>	28
TRATAMENTO ESTATÍSTICO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
TRABALHO	36
ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE GLICONEOGÊNICA DA ARANHA CARANGUEJEIRA (GRAMMOSTOLA SP – MYGALOMORPHAE) DURANTE O INVERNO E O VERÃO	35
RESUMO.....	38
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS	43
ANIMAIS	43
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA HEMOLÍNFA	43
ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO DE GLICOGÊNIO	44
ESTUDO DA ATIVIDADE GLICONEOGÊNICA	44
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
RESULTADOS	47
GLICONEOGÊNESE A PARTIR DE [U-¹⁴C]-L-ALANINA	47
GLICONEOGÊNESE A PARTIR DE [U-¹⁴C]-L-LACTATO	47
GLICONEOGÊNESE A PARTIR DE [U-¹⁴C]-L-GLICEROL	48

DISCUSSÃO	50
FIGURAS	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	70
<i>ANEXO 1</i>	70
<i>ANEXO 2</i>	71
<i>ANEXO 3</i>	72
<i>ANEXO 4</i>	72

RESUMO

Estudos sobre metabolismo de invertebrados fornecem subsídios para o entendimento da capacidade que estes animais tem de interagir com o ambiente e neste realizar seu desenvolvimento e reprodução.

Poucos são os trabalhos que avaliam o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios nos diferentes tecidos de aracnídeos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade gliconeogênica da aranha caranguejeira (*Grammostola sp* – Migalomorphae) durante o inverno e o verão.

Foram utilizados exemplares de *Grammostola sp.* coletados na região geográfica conhecida como Vale do Taquari, localizada no Rio Grande do Sul. Os animais coletados permaneceram em biotério, acondicionados em caixas plásticas onde foram alimentados *ad Libitum*. A temperatura e o fotoperíodo foram mantidos naturais de acordo com o período do ano.

Os animais foram coletados nos períodos de Verão, correspondendo aos meses entre setembro e março, e Inverno para os meses correspondentes ao período entre abril e agosto.

Para os procedimentos experimentais foram removidos o hepatopâncreas, e hemolínfa. Foram realizadas medidas das concentrações de glicose na hemolínfa, glicogênio no hepatopâncreas, bem como a atividade gliconeogênica no hepatopâncreas incubados com L-alanina, L-lactato e L-glicerol radioativo.

As concentrações glicêmicas obtidas foram de 9,58 mg/dL de glicose no verão e 3,48 mg/dL de glicose no inverno. Os valores da concentração de glicogênio nos tecidos foram de 0,29 g% no verão e 0,034 g% no inverno.

Tanto para a glicemia quanto para a concentração tecidual de glicogênio os valores obtidos apresentam diferenças significativas entre o inverno e o verão.

A capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas, para os substratos analisados indicam que a gliconeogênese a partir de [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose se dá entre 15 e 120 minutos. Entretanto aos 5 minutos, os valores de conversão de [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose mostram-se próximos ao dos tempos anteriores não existindo diferenças significativas. Durante o período de inverno a incorporação de [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose aos 5 minutos mostra diferenças significativas ($P < 0,05$) em relação aos demais tempos de incubação.

Estudos sobre a gliconeogênese a partir de [U-¹⁴C]-L-lactato em ¹⁴C-glicose durante o verão não mostram uma mudança significativa ($P=0,626$) na produção de glicose entre os tempos estudados e os valores são relativamente baixos se comparados ao inverno. Os mesmos estudos realizados durante o inverno indicam uma incorporação significativamente maior no tempo de 15 minutos ($P=0,007$). Comparativamente, os valores de produção de glicose no inverno são aproximadamente seis vezes maiores que os níveis encontrados no verão.

Os resultados da atividade gliconeogênica a partir de [U-¹⁴C]-L-glicerol em ¹⁴C-glicose durante o verão mostram uma redução significativa ($P < 0,05$) aos 15

minutos em relação aos tempo de 30, 60, 120 e 180 minutos. Essa condição também e mantida nos meses correspondentes ao inverno.

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que a gliconeogênese, parece ser uma via de importância para o hepatopâncreas de carangueiras fazendo a manutenção dos níveis glicêmicos, pois de maneira geral as reservas teciduais de glicogênio apresentam baixos valores tanto no inverno quanto no verão.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos sobre metabolismo de invertebrados fornecem subsídios para o entendimento da capacidade que estes animais tem de interagir com o ambiente e neste realizar seu desenvolvimento e reprodução.

O estudo e a compreensão dos eventos metabólicos devem considerar as variações sazonais às quais uma espécie está sujeita. Alterações na temperatura e fotoperíodo, em razão da passagem seqüencial das estações do ano, modificam o metabolismo, assim como a oferta de alimento e a competição por estes recursos (Kucharski e Da Silva,1991; Krasnov e Shenbrot,1997). O hábito de hibernar, é uma estratégia utilizada por muitos animais, principalmente os heterotérmicos que, ao buscarem abrigo em tocas, onde as variações de temperatura e concentração de O₂ não tem uma influência direta das variáveis ambientais, mantendo-se praticamente constante ao longo do período de hibernação, necessitam adequar o metabolismo ao período de restrição alimentar e de baixa disponibilidade de O₂.

Existem animais, como os gastrópodes terrestres, que resistem a ciclos de normóxia e hipóxia. Durante os períodos de estiva retraem-se em suas conchas, fechando-as com o epifragma (envoltório mucoso), evitando assim a perda excessiva de água. Já os animais mergulhadores, experimentam profunda hipóxia em muitos de seus órgãos, causados por ajustes circulatórios que redirecionam o sangue oxigenado aos músculos esqueléticos e ao cérebro (Storey & Storey, 1990).

Ao enfrentarem essas situações de estresse ambiental, os organismos adotam uma estratégia em comum, para maximizar o tempo de sobrevivência, denominada depressão metabólica. Eles são capazes de diminuir seus níveis metabólicos para valores entre 10 e 30% de seu estado de repouso (Lutz & Storey, 1997; Hochachka & Lutz, 2001).

Estudos sobre a variação sazonal do metabolismo energético de *Chasmagnathus granulata* (Crustácea, Decapoda) realizados por Kucharski e Da Silva (1991), indicam que a glicemia é alta no inverno e verão e baixa no outono e primavera.

As concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e nos músculos são maiores no outono e inverno decrescendo durante a primavera e verão. Os músculos apresentam uma elevada quantidade de lipídios no verão, diminuindo durante o outono e o inverno. Entretanto, os lipídios no hepatopâncreas mantêm-se elevados, exceto durante o outono. (Kucharski e Da Silva, 1991) Estes autores demonstraram que os caranguejos apresentam alterações nos padrões metabólicos de lipídios e carboidratos no transcorrer das estações do ano.

Os padrões de ajustes metabólicos para o metabolismo energético em um animal podem sofrer mudanças de acordo com a variação de carboidratos, proteínas e lipídios contidos em sua dieta (Kucharski e Da Silva, 1990).

Mudanças ambientais impostas por alterações climáticas relacionadas as diferentes estações do ano expõe as diferentes espécies animais a períodos de hipóxia e restrição alimentar prolongado. Nos períodos de restrição alimentar,

outros mecanismos metabólicos são utilizados, tais como: a) reserva de substrato energético; b) mecanismos para a conversão de substratos lipídicos e protéicos e c) adequação das diversas funções orgânicas visando manter a homeostasia durante o período de restrição.

As aranhas ocupam uma importante posição entre a fauna de artrópodes como predadores em diferentes ecossistemas terrestres. Elas apresentam um papel também como reguladoras de espécies pragas na agricultura. Informações sobre a biologia das aranhas é fundamental para investigar o potencial biológico das aranhas como agentes controladores no ambiente. A utilização de uma variedade de espécie de insetos como alimento fornece à aranha um ótimo aporte nutricional para a sobrevivência e reprodução (Amalin e cols, 1998).

A energia necessária para as atividades das aranhas é obtida de fontes anaeróbicas e aeróbicas, sendo que o oxigênio obtido através de trocas com o ambiente via pulmões foliáceos (Anderson e Prestwich, 1985).

Uma variedade de fatores influenciam a atividade respiratória das aranhas, os mais importantes são a variação da temperatura, tamanho corporal, estágio de desenvolvimento, período anual, frequência da dieta, estado nutricional, muda, dimorfismo sexual, condição reprodutiva e padrão de atividade (McQueen, Jensen e Dyer, 1979).

A alimentação da caranguejeira é essencialmente carnívora, preferencialmente são utilizados como alimento insetos (Coleópteros, Ortópteros e Lepidópteros) não sendo descartados pequenos anfíbios, ofídios, filhotes de aves e

mamíferos, muitas vezes atacados no ninho. Outras aranhas como Armadeiras (*Phoneutria*) e Tarântulas (*Lycosa*) também são utilizadas como alimento. O canibalismo também acontece entre os representantes desse grupo tendo uma preferência a alimento vivo, desprezando, normalmente animais mortos (Bücherl, 1951).

Poucos são os trabalhos que avaliam o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios nos diferentes tecidos de aracnídeos. Um estudo de componentes orgânicos e inorgânicos da hemolinfa de duas espécies de aranhas, *Araneus gemma* e *Argiope trifasciata* foi publicado por Cohen (1980). O autor relata que a composição de proteínas, carboidratos, lipídios totais e ácidos graxos livres na hemolinfa das espécies estudadas é comparável à encontrada em insetos.

Punzo (1982), quantificou aminoácidos, carboidratos livres, ácidos graxos, lipídios e sais minerais na hemolinfa de aranhas do grupo das licosas. Os aminoácidos mais abundantes foram a prolina e a alanina. A concentração de aminoácidos livres foi em torno de 66,1 até 202,3 mg/100 mL. Este mesmo autor descreve que as concentrações dos substratos avaliados, foram semelhantes a aquelas relatadas para insetos, ratificando os resultados encontrados por Cohen (1980).

A composição química da hemolinfa em *Euripelma californicum* foi descrita por Schartau e Leidescher em 1983. A glicose foi o principal carboidrato identificado na hemolinfa, com concentração de 0,15 g/L. A concentração de proteínas foi de 56,9 g/L, enquanto a concentração de aminoácidos livres foi de

0,52 mmol/L e a prolina foi identificada como o aminoácido livre predominante na hemolínfa. A concentração de lipídios na hemolínfa de *Euripelma californicum* foi de 0,41 g/L, sendo os principais ácidos graxos o palmitílico e o esteárico (Schartau e Leidescher, 1983).

Segundo Haunerland e Bowers (1987), *Euripelma californicum* contém duas lipoproteínas identificáveis com Sudan Black. Uma lipoproteína de VHDL (1,28 g/mL), contendo aproximadamente 8% de lipídio. Outra, uma HDL (1,12 mg/mL); contendo 56% de proteínas e 44% de lipídios.

Fosfolipídios e diacilglicerol são os maiores componentes lipídicos das HDL, quantidades significantes de monoacilglicerol, triacilglicerol e ácidos graxos livres também estão presentes na hemolínfa de *Euripelma californicum*. (Haunerland e Bowers, 1987).

Cunningham e cols, (2000) realizaram uma breve caracterização de lipoproteínas na hemolínfa de *Latrodectus mirabilis* (Araneae, Theridiidae). Os autores citados determinaram duas lipoproteínas de alta densidade (HDL₁ e HDL₂) presentes na hemolínfa de *Latrodectus mirabilis*. A HDL₁ corresponde a 80% do total de lipídios no plasma o qual é composto, predominantemente, por fosfolipídios, ácidos graxos livres e triacilgliceróis. A fração HDL₂, é composta primariamente de fosfolipídios, ácidos graxos livres e colesterol. Esta fração contém hemocianina como a principal apoproteína.

Foram realizados estudos de avaliação da atividade metabólica em uma série de aracnídeos os valores obtidos foram geralmente baixos em relação a

outros heterotérmicos de igual tamanho. A baixa taxa metabólica para os aracnídeos foi postulada como sendo uma adaptação a condição de predador. Ao enfrentar períodos quando o suprimento de alimento é incompatível com sua atividade o decremento metabólico propicia a manutenção das funções vitais até um novo período de alimentação regular (Anderson, 1969).

Estudos mostram a influência da temperatura sobre as rotas metabólicas de aranhas indicando que estas não são metabolicamente indiferentes para mudanças de temperatura entre 10 – 30 °C. Tais estudos também indicam a habilidade das aranhas de reduzir seu consumo de oxigênio até um terço do valor original durante a exposição a uma temperatura de 30°C, esta compensação não foi detectada para temperaturas de 10°C. (Anderson, 1969).

Dados da literatura oferecem informações conflitantes e incompletas sobre a concentração de carboidratos na hemolínfa de aranhas. Estudos de Barron (1999) sugere que a glicose é o único carboidrato presente na hemolínfa e que existe uma grande variação individual na concentração da glicose na hemolínfa de aranhas. Essas variações podem refletir as condições fisiológicas e o estresse ambiental ao qual o animal está sujeito.

Han e cols em 2004, identificaram e clonaram o gene responsável pela síntese de quitinase no corpo graxo de *Araneus ventricosus*, provavelmente uma adaptação à insetivoria. Essa enzima seria responsável pela digestão do exoesqueleto quitinoso dos insetos.

A gliconeogênese é um processo bem documentado em vertebrados. A precisa contribuição dessa via na manutenção da glicemia difere conforme a espécie e a capacidade de adaptação bioquímica da espécie às mudanças dos níveis glicêmicos (Oliveira, 1993).

Diversos trabalhos, principalmente em vertebrados, têm demonstrado o efeito da dieta e do hábito alimentar sobre a via gliconeogênica, tanto no estado alimentado como durante o jejum (Oliveira, 1993). Em invertebrados, ainda, segundo o autor, poucos trabalhos têm abordado a influência dos parâmetros ambientais, tais como a hipóxia, ou redução do O₂ ambiental, a temperatura e a salinidade ou desidratação, sobre as taxas de gliconeogênese.

Segundo Moon (1988), a gliconeogênese seria uma via bastante antiga filogeneticamente, visto que é encontrada, desde fungos até mamíferos, incluindo o homem.

Estudos em vertebrados têm demonstrado que a glicogenólise hepática é responsável pelo aumento inicial na produção de glicose sendo a gliconeogênese o processo primário através do qual a produção de glicose é sustentada quando a hipoglicemia é prolongada (Cersosimo e cols, 2000).

Estudos têm buscado identificar a presença da via gliconeogênica em diferentes grupos de artrópodes. Storey e Bailey (1978) verificaram a presença de enzimas da via gliconeogênica em baratas. Gourdoux e cols.(1983), estudaram, *in vitro*, a capacidade gliconeogênica no besouro *Tenebrio molitor* a partir de alanina, ácido aspártico ou ácido glutâmico e verificaram que a alanina foi o precursor

preferencial na conversão para trealose. Thompson (1995), estudando a gliconeogênese e o efeito do status nutricional na atividade do ciclo do ácido tricarboxílico na mariposa *Manduca sexta*, relata que a manutenção dos níveis de trealose hemolinfática em insetos parece diferir daquela observada em vertebrados nos quais a glicemia é inicialmente mantida pela mobilização do glicogênio do fígado e, subseqüentemente, pela gliconeogênese hepática. Sendo que a contribuição da via gliconeogênica em insetos para a manutenção dos níveis de trealose sanguínea não esta ainda esclarecida. O mesmo autor sugere que o órgão responsável pela efetivação da gliconeogênese nos insetos é o corpo graxo. Thompson (2000), em estudos subseqüentes sobre o ciclo do piruvato e suas implicações para a regulação da gliconeogênese no inseto *Manduca sexta* mostrou que a manutenção dos níveis de trealose na hemolínfa através da via gliconeogênica foi regulada em um período mais longo de tempo, como resposta a uma dieta pobre em carboidratos.

Estudos realizados em comunidades de coleópteros indicam que a abundância destes insetos varia no decorrer das estações do ano. Fatores ambientais podem ser responsáveis por esta variação sazonal tais como: disponibilidade anual de vegetação, temperatura do ar, umidade do solo e predadores (Krasnov e Shenbrot, 1997).

Estudos em crustáceos realizados por Rosas e cols. (2001) sobre metabolismo e crescimento de camarões juvenis de *Litopenaeus vannamei* avaliaram o efeito da salinidade e dos níveis de carboidratos. Através deste estudo

os autores identificaram a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) como a enzima chave da via gliconeogênica, sendo que, em crustáceos, o hepatopâncreas atua como centro do metabolismo de carboidratos e sede para a gliconeogênese. Os resultados expressos por estes autores sugerem que os camarões possuem uma alta plasticidade na utilização de proteínas como fonte de energia utilizando a via gliconeogênica para a produção de carboidratos.

Oliveira e Da Silva, (2000) sugerem que a via gliconeogênica desempenha importante papel na adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo *Chasmagnathus granulata*. A capacidade para síntese de glicose no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata*, associado com a atividade da PEPCK demonstra um tecido importante para gliconeogênese (Oliveira e Da Silva, 1997).

Segundo Oliveira (2000), quantitativamente, o aminoácido precursor significativo da via gliconeogênica em vertebrados é a alanina. Em *Chasmagnathus granulata* a atividade gliconeogênica hepatopancreática é identificada pela capacidade de conversão de ^{14}C -alanina e ^{14}C -lactato em glicose.

JUSTIFICATIVA

A partir da revisão bibliográfica, pode-se constatar um reduzido número de trabalhos de investigação sobre o metabolismo intermediário em aracnídeos. O metabolismo intermediário dos diferentes tecidos das aranhas não é efetivamente conhecido.

As aranhas são importantes reguladores populacionais em razão de sua natureza predadora. Esse grupo de artrópodes é, ainda hoje, causador de diversos acidentes envolvendo o trabalhador rural e os animais domésticos, onerando o orçamento familiar e público.

As aranhas da família Mygalomorphae têm sido amplamente utilizadas como animais de estimação em residências familiares gaúchas.

Em razão de seu hábitat estar relacionado a regiões de vegetação densa a presença de populações de caranguejeiras pode ser um bom indicador de qualidade do ambiente natural.

Em razão da excelente adaptação as condições de laboratório e facilidade de manuseio, as caranguejeiras tornam-se um modelo biológico interessante para a investigação do controle do metabolismo intermediário em aracnídeos.

OBJETIVOS

Em função do conhecimento que se tem sobre a influência da temperatura e fotoperíodo sobre o metabolismo de invertebrados em geral, estudos com as aranhas caranguejeiras *Grammostola sp*, tornam-se relevantes no sentido de avaliar quais são as estratégias utilizadas pela mesma, ao enfrentar essas situações de mudanças sazonais. Para incrementar o conhecimento sobre a biologia dos aracnídeos em especial da *Grammostola sp*, o presente trabalho teve como objetivo geral, avaliar a presença e a capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas da aranha *Grammostola sp*.

E como objetivos específicos:

Determinar a glicose na hemolínfa durante os períodos de verão e inverno.

Determinar as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas nos períodos de inverno e de verão.

Avaliar a capacidade gliconeogênica do hepatopâncreas nos períodos de verão e inverno a partir dos substratos: ^{14}C L-alanina, ^{14}C L-lactato e ^{14}C L-glicerol.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização dos animais

Foram utilizados exemplares machos e fêmeas adultos de aranha caranguejeira *Grammostola sp.* coletadas na região geográfica conhecida como Vale do Taquari, localizada no centro do Estado do Rio Grande do Sul (anexo 1). Cabe salientar que não foram observadas diferenças significativas entre machos e fêmeas nos parâmetros analisados. Os animais coletados permaneceram em biotério, acondicionados em caixas plásticas com medidas de 45 cm x 22 cm x 15 cm onde foram alimentados com filhotes neonatos de *Mus musculus*, *Ratus norvergicus*. Grilos, baratas e besouros, sempre que possível, também foram utilizados como alimento (Figs. 1, 2 e 3). A oferta de alimentos foi feita uma vez por semana *ad Libitum*. A temperatura e o fotoperíodo não foram controlados seguindo o perfil sazonal da região para o inverno e o verão, conforme pode-se observar na figura 3.



Figura 1: Detalhe da caixa de criação para a aclimação e manutenção dos animais em biotério.



Figura 2: Detalhe do interior da caixa de criação mostrando um vidro embrulhado em jornal imitando uma toca.



Figura 3: Vista geral do ambiente de instalação do biotério. Em destaque as caixas de criação.

As aranhas do gênero *Grammostola* estão entre os maiores aracnídeos do Sul do Brasil, são animais cujo comprimento do corpo pode atingir tamanhos de 220 a 260 mm da extremidade de uma perna a outra, na fase adulta. O corpo é recoberto por uma grande quantidade de pêlos curtos de coloração castanha escuro. (Bücherl, 1951) (Anexo 3).

Especificamente sobre as caranguejeiras (Mygalomorphae), Foelix, (1996), registra que estas apresentam glândulas muito pequenas e localizadas dentro da quelícera. Em contraste com outras Labdognatas que apresentam grandes glândulas de peçonha localizadas fora das quelíceras no cefalotórax. Eventualmente em razão do ataque do aracnídeo o empecoamento é medicado não deixando seqüelas.

Casos mais graves de acidentes envolvendo essas aranhas são causados pelos tricocistos que são raspados do opistossoma pelo último par de patas e liberados no ar. Em contato com a pele ou mucosas os tricocistos causam grande irritação podendo levar a formação de feridas e infecções locais (Bücherl, 1951).

A *Grammostola* prefere viver em ambientes de vegetação arbórea e úmida em solos rochosos. É relativamente sedentária procurando tocas entre as pedras e mesmo entre galhos caídos para fazer seus ninhos. A fêmea passa a maior parte de sua vida próxima às tocas enquanto os machos vivem de forma errante. À noite, ou em tardes nubladas, abandonam seu esconderijo para caçar ou reproduzir (Bücherl, 1951).

O sistema circulatório das aranhas é, como em muitos invertebrados, um sistema aberto com o coração localizado sobre o dorso do hepatopâncreas no opistossoma. Ele é formado por um tubo muscular localizado em uma ampla câmara (*sinus pericardial*) (Foelix, 1996).

A hemolínfa, tem como elemento principal, células denominadas hemócitos.

Estudos sobre as funções destas células relacionam sua participação na coagulação do sangue, cicatrização e como agente anti-infeccioso. Os hemócitos contêm hemocianina, pigmento responsável pelo transporte de O₂. A hemocianina é sintetizada nos cianócitos e é a proteína mais abundante na hemolínfa, podendo ultrapassar a 80% de sua composição. Outras substâncias orgânicas como aminoácidos (principalmente a prolina), carboidratos (principalmente a glicose) e ácidos graxos (palmítico, linoléico e ácido esteárico) estão presentes na hemolínfa (Foelix, 1996).

Quando a *Grammostola* se alimenta, ela se precipita sobre a vítima, encrava nela seus longos e robustos ferrões, injetando o veneno e mantendo a presa suspensa até que se verifique o efeito paralisante do veneno. Só então a aranha principia a comer triturando a vítima, aos poucos, com os dentes nas quelíceras e com os palpos empurrando o alimento para dentro da boca (Bücherl, 1951)

Segundo Foelix, (1996), as aranhas desenvolveram um modo não usual para iniciar seus processos digestórios. Após subjugar a presa, utilizando-se de sua peçonha, a aranha regurgita fluídos intestinais sobre o animal. A peçonha é, em um primeiro momento, utilizada para paralisar a presa, seu efeito letal é

secundário (Foelix,1996). A quase totalidade das aranhas possui um par de glândulas de peçonha localizadas no prossoma. Cada glândula de peçonha consiste de um tecido celular com formato de cilindro e um ducto adjacente que termina em uma goteira no colmilho da quelícera. Foelix, (1996), explica que a inoculação da peçonha se dá pela contração de grandes músculos em espiral que circundam a glândula de peçonha. Quimicamente o veneno das aranhas é bastante heterogêneo podendo conter diferentes substâncias. Ele é principalmente uma mistura de polipeptídios neurotóxicos, em grandes quantidades, e pequenas quantidades de amins biogênicas e aminoácidos; enzimas proteolíticas também podem estar presentes (Foelix, 1996).

Esses fluidos pré-digerem gradualmente os tecidos corporais, ao mesmo tempo em que são sugados pela aranha. Esta forma de digestão é freqüentemente mencionada como digestão extracorpórea, sendo que a peçonha atua como enzima digestória sobre os tecidos internos da presa.

A digestão interna, segundo Foelix,1996, tem seu início após o alimento liquefeito ser sugado, por uma estreita abertura bucal, por ação dos músculos da faringe e do estômago. Nesta ocasião, um conjunto de cerdas bucais, localizado junto à abertura bucal processa a filtração do fluido alimentar. Uma segunda filtração ocorre na faringe por ocasião da passagem do alimento junto ao forro rostral cuticular. Esta placa no palato possui um sulco mediano e milhares de plaquetas arranjadas com telhas. Somente partículas muito pequenas ($< 1\mu\text{m}$)

podem passar por esse filtro. As partículas maiores acabam retidas em razão de seu tamanho.

O alimento é encaminhado ao estômago por um estreito esôfago. O estômago apresenta um diâmetro grande. Em secção transversal tem uma forma quadrangular. Esta forma é efetivada em razão das paredes flexíveis de cutícula que permanecem colapsadas durante o repouso (Foelix,1996).

O intestino médio, que se segue ao estômago, tem sua parte proximal localizada no prossoma e sua parte media e distal localizada no opistossoma. O tecido de revestimento interno do intestino médio mostra-se com muitas vilosidades, tendo ao seu redor muitas glândulas e o trato reprodutivo. Divertículos intestinais são abundantes e presentes, principalmente no opistossoma.

O desenvolvimento intestinal se justifica pois as aranhas podem sobreviver por longos períodos sem alimentarem-se. Em experimentos com Viúvas-negras adultas verificou-se a capacidade destes animais viverem até 200 dias sem se alimentarem (Kaston,1970).

Caracterização do ambiente de coleta

Geomorfologia

A região da área em estudo, pertence à Unidade Geomorfológica Patamares da Serra Geral com domínio morfoestrutural das Bacias e Coberturas Sedimentares

e com Modelado de Acumulação fluvio-lagunar formado por terraços e Planícies Fluviais (Magna Engenharia Ltda., 1997).

Essa unidade engloba formas em colinas com pequeno aprofundamento dos vales fluviais, formas de relevo que apresentam forte controle estrutural e ocorrem formas planares. Os relevos, associados diretamente ao pronunciado escarpamento dos Aparados da Serra, compreendem níveis profundos de dissecção e de detalhamento da drenagem que se apresentam controlados por inúmeras linhas estruturais. A área dos Patamares da Serra Geral em contato com a Depressão rio Jacuí está mais compatível com a denominação – Patamares, uma vez que se expressa em formas mais rebaixadas e contínuas, embora seccionadas pelos cursos fluviais (Teixeira & Neto, 1986).

Nas áreas correspondentes às bacias dos rios Caí e Taquari, a atividade agrícola vem sendo empregada crescentemente, substituindo a cobertura vegetal original que se refere à Floresta Estacional Decidual (Teixeira & Neto, 1986).

Vegetação

A formação vegetal que ocupa a área da região do vale do Taquari, é classificada, segundo Teixeira e Neto, (1986), como Floresta Estacional Decidual. A denominação de Floresta Estacional refere-se à dependência da vegetação em relação às estações do ano, e a denominação decidual justifica-se pelo fato de 60% das árvores perderem as folhas no outono/inverno.

A Floresta Estacional tem dois estratos arbóreos distintos: um emergente, aberto e decíduo, com altura variando entre 25 e 30 metros, e outro, dominado e contínuo, com altura não superior a 20 metros, com espécies perenifólias, além de um estrato de arvoretas.

No território sul brasileiro, o caráter de sazonalidade do clima para esta região florestal é determinado pelo período de baixas temperaturas, que exercem sobre as plantas o mesmo efeito da seca. (Teixeira e Neto, 1986).

Clima

O clima regional é do tipo subtropical úmido, com duas variedades principais: Cfa e Cfb. A variedade Cfa abrangendo altitudes superiores a 600 m, caracteriza-se por temperaturas médias compreendidas entre -3°C e 18°C para os meses mais frios e superiores a 22°C para o mês mais quente, A variedade Cfb diferencia-se basicamente pelas temperaturas médias do mês mais quente; $13,4^{\circ}\text{C}$ a temperatura mínima e $35,8^{\circ}\text{C}$ a temperatura máxima. (Tabela 2 em anexos)

Para a realização deste trabalho determinou-se que o período entre os meses de setembro a março, com temperatura média de $22,8^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo médio de 14 h de luz por dia, como Verão. O período entre os meses de abril a agosto, onde a temperatura média foi de $16,3^{\circ}\text{C}$ e o fotoperíodo médio de 11 h de luz por dia, foi denominado de inverno. Os dados aqui apresentados, em anexo 2, foram obtidos junto a Estação Meteorológica da Prefeitura de Lajeado.



Figura 4 : Vista geral do local de coleta



(a)



(b)



Figura 5: a) detalhe do ambiente de coleta. b) detalhe da toca

Morfologia

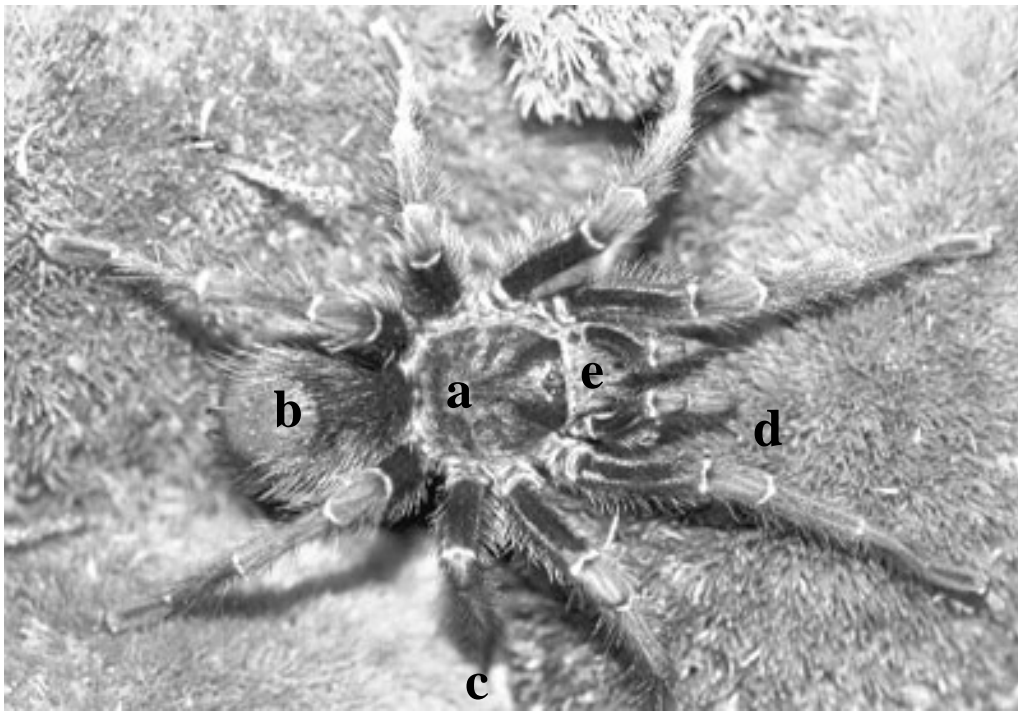


Figura 6: Morfologia externa indicando os tagmas e apêndices corporais: a) prossoma, b) opistossoma, c) patas, d) pedipalpos, e) quelíceras.

Procedimentos experimentais

Durante o período experimental que foi de fevereiro de 2001 até agosto de 2004, os animais foram coletados nos meses de verão e de inverno e posteriormente foram mantidos com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e alimentação por pelo menos vinte dias em biotério antes dos experimentos.

Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina, 0,023 g/mL intramuscular no ventre do próssoma. A hemolínfa foi coletada das 4^o e 5^o articulações do terceiro par de patas (figura 6c), com a utilização de seringas de 1 mL e anticoagulante oxalato de potássio a 10% (Figura 6). Após a paralisação do animal, foi removido o hepatopâncreas, contido no opistossoma (figura 6b) para as doseagens bioquímicas e atividade gliconeogênica.

DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Determinação da concentração de glicose na hemolínfa

Os níveis de glicose na hemolínfa foram determinados pelo método enzimático da glicose-oxidase com o kit Glicose Enz-Color (marca BIO DIAGNÓSTICA INDÚSTRIA CLÍNICA LTDA.). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Isolamento e determinação de glicogênio

O isolamento do glicogênio do hepatopâncreas e do músculo das patas seguiu o método descrito por Van Handel (1965) e determinado como glicose após a hidrólise ácida, como descrito por Geary et al. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color). A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos foi expressa em mg/g de tecido úmido.

Estudo da atividade gliconeogênica

A determinação da glicose-¹⁴C foi realizada através de cromatografia em camada fina (placas de alumínio com sílica gel 60 MERCK), conforme método descrito por Baker e cols. (1965). Após o sacrifício do animal com 0,2ml de cloridrato de ketamina, o hepatopâncreas foi retirado e imerso em solução fisiológica gelada segundo Rathmayer (1965) com as seguintes concentrações: 220mM NaCl, 5mM KCl, 4mM CaCl₂, 1,1mM MgCl₂, 3mM HCO₂ e TRIS para correção do pH 7,3. O hepatopâncreas foi fracionado em tiras com aproximadamente 150mg para a incubação. Foram preparados três diferentes meios de incubação: 1 - 500μL de solução fisiológica mais 5mM de L-alanina não marcada e 0,2μCi [U-¹⁴C]-L-alanina; 2 - 500μL de solução fisiológica mais 5 mM de, L-lactato não marcado e 0,2μCi [U-¹⁴C]-L-lactato; 3 - 500μL de solução fisiológica mais 5 mM de L-glicerol não marcada e 0,2μCi [U-¹⁴C]-L-glicerol. Após os tubos foram aerados com uma mistura de O₂:CO₂ na proporção de 95:5% por

30 segundos para substituição da fase gasosa, após fechados e incubados em banho metabólico do tipo Dubnoff a 25°C sob agitação constante. A captação nos tecidos foi interrompida ao final dos tempos preestabelecidos colocando os tubos em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 6.000 rpm e o sobrenadante foi retirado e desproteinizado com 75µL de BaOH₂ saturado e 75µL de ZnSO₄ a 20%. Após nova centrifugação a 6.000 rpm por 10 min. retirou-se 300µL de sobrenadante que foi acondicionado em tubos eppendorfs e congelados para posterior cromatografia.

Utilizou-se como solução carreadora de 200 mL da mistura de solventes constituída de n-butanol:álcool etílico 95%:ácido acético 5,4% na proporção de 500:316:184 (v/v/v). A atmosfera da cuba era previamente saturada. Ao solvente era permitido correr 6 cm na placa a partir do ponto de origem, onde eram aplicadas as amostras. Foram aplicados 10µL da amostra juntamente com 10µL de um padrão de glicose não marcada na concentração de 1 mg/mL e, como controle, foram utilizados 10µL da solução padrão. A glicose foi revelada com uma solução de álcool etílico 95%:ácido sulfúrico concentrado: anisaldeído na proporção de 18:1:1 (v/v/v). As manchas com aproximadamente 2 cm, eram recortadas e colocadas diretamente em 2,5ml de líquido de cintilação [Tolueno-Triton X-100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)]. Durante 24 horas as amostras foram deixadas sob refrigeração (4-7°C) para a sílica dissolver. A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallacc), calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram expressos em nmoles de [U-¹⁴

C]-L-alanina, [U-¹⁴ C]-L-lactato e [U-¹⁴ C]-L-glicerol convertidos em ¹⁴ C glicose.g⁻¹ de tecido.

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos (\pm) o desvio padrão da média (SD). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois grupos foi feita usando o teste t de Student para dados não pareados. Para as curvas de tempo foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas se os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat compatível com Windows 95 (versão 2.0).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amalin, D. M. Reiskind, J., McSorley, R., and Peña, J., 1998. Survival of the hunting spider, *Hibana velox* (Aranae, Anyphaenidae), raised on different artificial diets. *The J. Aracnology*. 27: 692-696
- Anderson, J. F., 1969. Metabolic rates of spider. *Comp. Biochem. Physiol.* 33:51-72
- Anderson, J. F., and Prestwich, K. N., 1985. The physiology of exercise at and above maximal aerobic capacity in a theraphosid (Tarantula) spider, *Brachypelma smithi* (F.O. Pickard – Cambridge). *J. of Comp. Physiol B*. 155: 529–539.
- Baker, N., Huebotter, R. J., Schotz, M. C., 1965. Analisis of glucose – ¹⁴C in tissues using thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 10: 222-235.
- Barron, P. D., 1999. Carbohydrate analysis in spider hemolymph of selected lycosid and araneid spiders (Araneae: Lycosidae and Araneidae). *The J. of Aracnology*. 27: 550-552.
- Bücherl, W., 1951. Estudos sobre a biologia e a sistemática do gênero GRAMMOSTOLA Simon, 1892. Monografias do Instituto Butantan.
- Carr, R.S., Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77B (3) 447-449.
- Cersosimo, E., Garlick, P., Ferretti, J., 2000. Renal Substrate Metabolism and Gluconeogenesis During Hypoglycemia in Humans. *Diabetes*, 49: 1186-1192.
- Clarket, A. and Fraser, P. P., 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Funcional Ecology*. 18: 243-251.
- Cohen, A., 1980. Hemolymph chemistry of two species of araneid spiders. *Comp. Biochem. Physiol.* 66 A:715-717.
- Cunningham, M. González, A. & Pollero, R., 2000. Characterization of Lipoproteins Isolated from Hemolymph of the Spider *Latrodectus mirabilis* (Araneae, Theridiidae). *The Journal of Arachnology*, 28:49-55.
- Foelix, R. F., 1996. *Biology of spider*. Oxford University Press. 1-330
- Geary, N.; Langhans, W.; Scharrer, E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.*, 241(10): R330-335.

- Gourdoux, L. Lequellec, Y. Moreau, R. and Dutriem, I., 1983. Gluconeogenesis from some amino acids and its endocrine modification in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* 74 B, (2): 273-276.
- Han, J. H., Lee, K. S., Li, J., Kim, J., Je, Y. H., Kim, D. H., Sohn, H. D., Jin, B. R., 2004. Cloning and expression of a body-specific chitinase cDNA from the spider, *Araneus ventricosus*, *Comp. Biochem. Physiol.* B. xx: 1-9.
- Hauerland, N. H. & Bowers, W. S., 1987. Lipoproteins in the hemolymph of the Tarantula, *Eurypelma californicum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 86 B, N° 3, 571-574.
- Hochachka, P.W. & Lutz, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* B130:435-459.
- Kaston, B. J., 1970 Comparative biology of American black widow spiders. *Transact. San Diego. Soc. Nat. Hist.* 16-33
- Kettelhut, I. C., Foss, M. C. and Migliorini, R. H., 1980. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and rats fed a high-protein diet. *Am. J. Physiol.* 239: 437-444.
- Krasnov, B. and Shenbrot, G., 1997. Seasonal variation in spatial organization of a darkling beetle (Coleoptera : Tenebrionidae) community. *Entomological Society of America*: 178 – 190.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M. 1991. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Comp. Biochem. Physiol.* A99, 215-218.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M. 1991b. Seasonal Variation in the energy metabolism in an estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A (3):599 – 602.
- Leningher, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2002. Principles of Biochemistry, 3rded. New York: Worth Publisher.
- Lutz, P.L. & Storey, K.B., 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: *Handbook of Physiology – Comparative Physiology*. Dantzler, W.H. (ed.), Oxford: American Physiological Society, vol. II.
- Moon, T. W. (1988). Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.* 66, 1059-1068.
- McQueen, D. J., 1979. Active respiration rates for the burrowing Wolf Spider *Geolycosa domifex* (Hancock). *Can. J. Zool.* 58: 1066-1074.

- Oliveira, G. T., 1993. Estudo in vitro da Gliconeogênese no hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae). Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Oliveira, G. T. and Da Silva, R. S. M., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 118 A, 1429-1435.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S. M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, B127, 375-381.
- Punzo, F., 1982. Hemolymph Chemistry of Lycisid Spider. *Comp. Biochem. Physiol.*, 71 B N° 4, 703-707.
- Porcher, R. D. e Kucharski, L. C. R., 2002. Variação sazonal das reservas energéticas da aranha caranguejeira *Grammostola* sp. (Araneida – Mygalomorphae). In: XVII FeSBE. Salvador, BA.
- Porcher, R. D., Kucharski, L. C., et al. , 2003. Avaliação das reservas enrgeticas da aranha caranguejeira *Grammostola* sp (Araneida - Mygalomorphae) durante o inverno e o verão. In: IV Encontro de Aracnólogos do Cone Sul, Sao Paulo.
- Porcher, R. D. e Kucharski, L. C. R., 2004. Estudo da atividade gliconeogênica da aranha caranguejeira *Grammostola* sp. (Araneida – Mygalomorphae). In: XIX FeSBE. Águas de Lindóia, SP.
- Rathmayer, W., 1964. Neuromuscular transmission in a spider and the effect of calcium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 14: 673-687.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Arena L., Lemaire, P., Soyez, C., and Van Wormhoudt A., 2000. Influence of dietary carbohydrates on the metabolism of juveniles *Litopenaeus stylirostris*. *J Exp Mar Biol Ecol* 249:181 - 198.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Le Priol, Y., Pascual C., Rossignol, G., Contreras, F. Sanchez, A., and Van Wormhoudt A., 2001. Metabolism and Growth of Juveniles of *Litopenaeus vannamei* effect of salinity and dietary carbohydrates levels. *J Exp Mar Biol Ecol* 259:1 - 22.
- Santos, E.A.; Nery, L.E. M.; Manzone, G.C., 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, rapsidade). *Comp. Biochem. Physiol.* A89, 329-332.

- Schartau, W. & Leidescher, T., 1983. Composition of the hemolymph of the Tarantula, *Eurypelma californicum*. *Journal of Comparative Physiology – B*, 152 : 73-77.
- Storey, K. B. and Baley, E., 1978. Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of adult Cockroach, *Periplaneta*. *Insect Biochem.* 8: 125-131.
- Storey, K.B. & Storey, J.M., 1990. Facultative metabolic rate depression: molecular regulation and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quart. Rev. Biol.* 65:145-174.
- Teixeira, M. B. e Neto, A. B., 1986. Folha SH.22 e parte das folhas SH. 21 e SI. 22 – Vegetação: Levantamento dos recursos naturais. 33; 541-620.
- Thompson, S. N., 1995. Gluconeogenesis and effect of nutritional status on TCA cycle in the insect, *Manduca Sexta* L. *Biochemical and Biophysical Acta* 1245: 376-384.
- Thompson, S. N., 2000. Pyruvate cycling and implications for regulation of gluconeogenesis in the insect, *Manduca Sexta* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274: 787-793.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. *Anal. Biochem.* 11, 226-265.

O trabalho que será apresentado nesta dissertação de mestrado, está formatado para uma futura versão para o inglês, com algumas adaptações para publicação no periódico "***Comparative Biochemistry and Physiology***" (regras no anexo 4).

TRABALHO

**ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE GLICONEOGÊNICA DA ARANHA
CARANGUEJEIRA (*Grammostola sp* – Mygalomorphae) DURANTE O
INVERNO E O VERÃO**

**ESTUDO SOBRE A CAPACIDADE GLICONEOGÊNICA DA
ARANHA CARANGUEJEIRA (*Grammostola sp* – Mygalomorphae)
DURANTE O INVERNO E O VERÃO**

1-Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada, Departamento
de Fisiologia/Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS)/UFRGS

2-Laboratório de Biologia de animais Peçonhentos, Museu de Ciências
Naturais ,UNIVATES

Autores: Rogério Daniel Porcher ^{1,2} & Luiz Carlos Kucharski ¹

Rogério Daniel Porcher
R. Sarmento Leite, 500 – Campus Centro
Porto Alegre-RS/Brasil
Fone: (51) 3316-3505
FAX: (51) 3316-3166
e-mail: porcher@bewnet.com.br

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade gliconeogênica da aranha caranguejeira (*Grammostola sp* – Mygalomorphae) durante o inverno e o verão.

Foram utilizados exemplares de *Grammostola sp.* provenientes da região geográfica conhecida como Vale do Taquari, localizada no Rio Grande do Sul, Brasil.

Para os procedimentos experimentais foram removidos o hepatopâncreas, coração, músculos e hemolinfa. Nos tecidos retirados foram dosadas as concentrações de glicose na hemolinfa, glicogênio nos demais tecidos, bem como a atividade gliconeogênica no hepatopâncreas a partir de [U-¹⁴C]-L-alanina, [U-¹⁴C]-L-lactato e [U-¹⁴C]-L-glicerol, respectivamente.

Os resultados obtidos demonstraram que, no verão, os substratos preferencialmente utilizados são a alanina e glicerol enquanto, durante o período de inverno, a *Grammostola sp.* utiliza preferencialmente o lactato e glicerol. A glicemia e a concentração de glicogênio tecidual mostram-se significativamente elevadas no verão em relação ao inverno.

Tanto para a glicemia quanto para a concentração tecidual de glicogênio os valores obtidos indicam diferenças significativas.

Os resultados apresentados mostram que as reservas de glicogênio, nos tecidos estudados, são baixas, tanto no verão quanto no inverno. Por outro lado a

análise da atividade gliconeogênica no hepatopâncreas permite concluir que esta rota metabólica deve ser a maior responsável pela manutenção dos níveis glicêmicos na aranha caranguejeira.

Título da página: Capacidade gliconeogênica em *Grammostola* sp.

Palavras-chave:

Gliconeogênese, Metabolismo, Aranha Caranguejeira, *Grammostola*, Variação Sazonal.

INTRODUÇÃO

Estudos sobre metabolismo de invertebrados fornecem subsídios para o entendimento da capacidade que estes animais tem de interagir com o ambiente e neste realizar seu desenvolvimento e reprodução.

Para maximizar o tempo de sobrevivência em situações de estresse ambiental, os animais vertebrados e invertebrados adotam uma estratégia em comum, denominada depressão metabólica. Eles são capazes de diminuir seus níveis metabólicos para valores entre 10 e 30% de seu estado de repouso (Lutz & Storey, 1997; Hochachka & Lutz, 2001).

Poucos são os trabalhos que avaliam o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios nos diferentes tecidos de aracnídeos. A análise dos componentes orgânicos e inorgânicos da hemolínfa de duas espécies de aranhas, *Araneus gemma* e *Argiope trifasciata* foi publicado por Cohen (1980).

Estudos sobre a variação sazonal do metabolismo energético de *Chasmagnathus granulata* (Crustácea, Decapoda), indicam que a glicemia é alta no inverno e verão e baixa no outono e primavera. As concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e nos músculos são maiores no outono e inverno decrescendo durante a primavera e verão. Os músculos apresentam uma elevada quantidade de lipídios no verão, diminuindo durante o outono e o inverno. Entretanto os lipídios no hepatopâncreas mantêm-se elevados, exceto durante o outono. (Kucharski e Da Silva, 1991).

Dados da literatura oferecem informações conflitantes e incompletas sobre a concentração de carboidratos da hemolinfa de aranhas. Seu estudo sugere que a glicose é o único carboidrato presente na hemolinfa e existe uma grande variação individual na concentração da glicose na hemolinfa de aranhas. Essas variações podem refletir as condições fisiológicas e o estresse ambiental ao qual o animal está sujeito (Barron, 1999).

Segundo Thompson (1995), a contribuição da via gliconeogênica em insetos para a manutenção dos níveis de trealose sanguínea não está ainda esclarecida. O mesmo autor sugere que o órgão responsável pela efetivação da gliconeogênese nos insetos é o corpo graxo. Em estudos subsequentes sobre o ciclo do piruvato e suas implicações para a regulação da gliconeogênese na mariposa *Manduca sexta*, Thompson (2000) afirma que a manutenção dos níveis de trealose na hemolinfa através da via gliconeogênica foi regulada principalmente em longo prazo em resposta a uma dieta pobre em carboidratos.

Diversos trabalhos, principalmente em vertebrados, têm demonstrado o efeito da dieta e do hábito alimentar sobre a via gliconeogênica, tanto no estado alimentado como durante o jejum (Oliveira, 1993), ainda, segundo o autor, poucos trabalhos têm abordado a influência dos parâmetros ambientais, tais como a hipóxia, ou redução do O₂ ambiental, a temperatura e a salinidade, sobre as taxas de gliconeogênese em invertebrados.

Oliveira e Da Silva, (2000) sugerem que a via gliconeogênica desempenha importante papel na adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo

Chasmagnathus granulata. A capacidade para síntese de glicose no hepatopâncreas de *Chasmagnathus granulata* associado com a atividade da PEPCK demonstra a importância deste tecido para a gliconeogênese (Oliveira e Da Silva, 1997).

Em função do conhecimento que se tem sobre a influência da temperatura e do fotoperíodo sobre o metabolismo de invertebrados em geral, o estudo com as aranhas caranguejeiras *Grammostola sp*, torna-se relevante no sentido de avaliar quais são as estratégias metabólicas utilizadas pela mesma, ao enfrentar essas situações de mudanças sazonais.

Para tanto o trabalho se propõe: a avaliar a presença e a capacidade gliconeogênica no hepatopâncreas da aranha *Grammostola sp*. nos períodos de verão e inverno. Determinar a concentração de glicose na hemolinfa durante os períodos de verão e inverno. Determinar as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas nos períodos de inverno e de verão. Avaliar a capacidade gliconeogênica do hepatopâncreas nos períodos de verão e inverno a partir dos seguintes substratos: ^{14}C L-alanina, ^{14}C L-lactato e ^{14}C L-glicerol.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados exemplares machos e fêmeas adultos de Aranha Caranguejeira *Grammostola* sp. coletadas na região geográfica conhecida como Vale do Taquari, localizada no centro do Estado do Rio Grande do Sul. Os animais coletados permaneceram no biotério, acondicionados em caixas plásticas onde foram alimentados com filhotes neonatos de *Mus musculus*, *Ratus norvegicus*. Grilos, baratas e besouros, sempre que possível, também foram utilizados como alimento. A oferta de alimentos foi feita uma vez por semana *ad Libitum*. A temperatura e o fotoperíodo foram mantidos naturais de acordo com o período do ano. Durante o período experimental que foi de fevereiro de 2001 até agosto de 2004, os animais foram coletados nos meses de verão e de inverno e posteriormente foram mantidos com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e alimentação por um período mínimo de 20 dias. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina, 0,023 g/mL intramuscular no ventre do próssoma. A hemolinfa foi coletada das articulações das 4^o e 5^o patas e após a paralisação do animal, foi removido o hepatopâncreas.

Determinação da concentração de glicose na hemolínfa

Os níveis de glicose na hemolínfa foram determinados pelo método enzimático da glicose-oxidase com o kit Glicose Enz-Color (marca BIO

DIAGNÓSTICA INDÚSTRIA CLÍNICA LTDA.). Os resultados foram expressos em mg/dL.

Isolamento e determinação de glicogênio

O isolamento do glicogênio do hepatopâncreas seguiu o método descrito por Van Handel (1965) e a concentração determinado, como glicose após a hidrólise ácida, como descrito por Geary et al. (1981), utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (kit Glicose Enz-Color). A concentração de glicogênio nos diferentes tecidos foi expressa em mg/g de tecido úmido.

Estudo da Atividade Gliconeogênica

Após anestesia, o hepatopâncreas foi retirado e imerso em solução fisiológica gelada segundo Rathmayer (1965) com as seguintes concentrações: 220mM NaCl, 5mM KCl, 4mM CaCl₂, 1,1mM MgCl₂, 3mM HCO₂ e TRIS para correção do pH 7,3. O hepatopâncreas foi fracionado em tiras com aproximadamente 150mg para a incubação. Foram preparados três diferentes meios de incubação: 1 - 500μL de solução fisiológica mais 5mM de L-alanina não marcada e 0,2μCi [U-¹⁴C]-L-alanina; 2 - 500μL de solução fisiológica mais 5mML de, L-lactato não marcado e 0,2μCi [U-¹⁴C]-L-lactato; 3 - 500μL de solução fisiológica mais 5mML de L-glicerol não marcada e 0,2μCi [U-¹⁴C]-L-glicerol. Após os tubos foram aerados com uma mistura de O₂:CO₂ na proporção de 95:5% por 30 segundos para substituição da fase gasosa, arrolhados, e incubados em banho

metabólico do tipo Dubnoff a 25°C sob agitação constante. A captação nos tecidos foi interrompida ao final dos tempos preestabelecidos colocando-se os tubos em banho de gelo. A determinação da glicose-¹⁴C foi realizada através de cromatografia em camada fina (placas de alumínio com sílica gel 60 MERCK), conforme método descrito por Baker e cols. (1965). As amostras foram centrifugadas por 10 min. a 6.000 rpm e o sobrenadante foi retirado e desproteinizado com 75µL de BaOH₂ saturado e 75µL de ZnSO₄ a 20%. Após nova centrifugação a 6.000 rpm por 10 min. retirou-se 300µL de sobrenadante que foi acondicionado em tubos eppendorfs e congelados para posterior cromatografia.

Utilizou-se como solução carreadora de 200 mL da mistura de solventes constituída de n-butanol:álcool etílico 95%:ácido acético 5,4% na proporção de 500:316:184 (v/v/v). A atmosfera da cuba era previamente saturada. Ao solvente era permitido correr 6 cm na placa a partir do ponto de origem, onde eram aplicadas as amostras. Foram aplicados 10µL da amostra juntamente com 10µL de um padrão de glicose não marcada na concentração de 1 mg/mL e, como controle, foram utilizados 10µL da solução padrão. A glicose foi revelada com uma solução de álcool etílico 95%:ácido sulfúrico concentrado: anisaldeído na proporção de 18:1:1 (v/v/v). As manchas com aproximadamente 2 cm, eram recortadas e colocadas diretamente em 2,5ml de líquido de cintilação [Tolueno-Triton X-100 (2:1) – PPO (0,4%) e POPOP (0,01%)]. Durante 24 horas as amostras foram deixadas sob refrigeração (4-7°C) para a sílica dissolver. A radioatividade foi medida em espectrômetro de cintilação líquida (LKB-Wallacc), calibrado com uma

curva de correção para DPM. Os resultados foram expressos em nmoles de substrato radioativo convertido em ^{14}C glicose por grama de tecido.

ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média mais ou menos (\pm) o desvio padrão da média (SD). Dos dados experimentais obtidos, a comparação entre dois pontos foi feita usando o teste t de Student para dados não pareados. Para as curvas de tempo foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas se os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05.

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat compatível com Windows 95 (versão 2.0).

RESULTADOS

Gliconeogênese a partir de [U-¹⁴C]-L-alanina

A figura 7 representa o efeito do tempo de incubação sobre a conversão de [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose no hepatopâncreas *de Grammostola sp* durante o verão. Verifica-se que a conversão do substrato em glicose foi crescente até 15 minutos mantendo-se constante até 120min.

A figura 8 apresenta a conversão de [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose no inverno. Da mesma forma que no verão aos 5 minutos se observa uma significativa produção de glicose. Entretanto nos tempos de 15, 30 e 120 minutos se observa uma redução da capacidade gliconeogênica ao contrario do observado para o verão.

Comparando-se os resultados obtidos na conversão de alanina em glicose expressos nas figuras 7 e 8 é possível observar que no inverno, aos 5 minutos, a síntese de glicose já atinge os níveis alcançados aos 15 minutos no verão. Entretanto nos tempos de 30, 60 e 120 minutos a conversão da [U-¹⁴C]-L-alanina em glicose aumenta, respectivamente; 2,9, 2,2 e 2,8 vezes.

Gliconeogênese a partir de [U-¹⁴C]-L-lactato

A figura 9 mostra os resultados obtidos na conversão de [U-¹⁴C]-L-lactato em ¹⁴C-glicose durante o verão. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tempos estudados, sendo os valores relativamente baixos se comparados ao inverno.

A conversão de [U-¹⁴C]-L-lactato em ¹⁴C-glicose durante o inverno é mostrada na figura 10. A análise da figura mostra uma significativa redução da síntese de glicose de 15 para 30 minutos, enquanto nos tempos de 60 e 120 minutos verifica-se um aumento progressivo da conversão de [U-¹⁴C]-L-lactato em ¹⁴C-glicose. Comparativamente, os valores de produção de glicose no inverno são aproximadamente seis vezes maiores que os níveis encontrados no verão.

Comparando-se os resultados apresentados nas figuras 9 e 10 é possível observar que a gliconeogênese a partir de lactato foi maior no inverno, sendo que entre os tempos de 15 e 120 minutos houve um aumento médio de 3,5 vezes na conversão de [U-¹⁴C]-L-lactato em glicose.

Gliconeogênese a partir de [U-¹⁴C]-L-glicerol

A figura 11 apresenta os resultados da atividade gliconeogênica a partir de [U-¹⁴C]-L-glicerol nos tempos de 15, 30, 60, 120 e 180 minutos, durante o período de verão. No tempo de 15 minutos a conversão do [U-¹⁴C]-L-glicerol em ¹⁴C-glicose é significativamente ($P=0,001$) menor quando comparada aos demais tempos estudados. A partir de 30 minutos a atividade gliconeogênica mostra um aumento até os 120 min. onde se observa o valor máximo e voltar a diminuir aos 180 min..

Na figura 12, observa-se a conversão de [U-¹⁴C]-L-glicerol em ¹⁴C-glicose durante o inverno. A curva de captação mostra um comportamento semelhante ao que acontece no verão. No tempo de 15 minutos a conversão é significativamente ($P= 0,001$) menor em relação aos demais tempos estudados. A atividade

gliconeogênica a partir de [U-¹⁴C]-L-glicerol aumenta até 60 minutos, decrescendo nos tempos de 120 e 180 minutos a atividade gliconeogênica mostra uma redução com valores menores aos 180 minutos.

A comparação da gliconeogênese a partir de [U-¹⁴C]-L-glicerol nos períodos de inverno e verão mostra que aos 15 minutos, no verão, verifica-se aumento de 1,5 vezes na conversão do [U-¹⁴C]-L-glicerol em glicose no verão comparado com o inverno. No inverno é possível identificar um aumento de 1,9 e 1,6 vezes nos tempos, respectivamente de 30 e 60 minutos. Aos 120 e 180 minutos a conversão de [U-¹⁴C]-L-glicerol em glicose mantém valores semelhantes entre o verão e o inverno e suas relações ficam muito próximas a 1,0 (1,02 e 1,1, respectivamente).

A figura 13 mostra as variações na concentração de glicose na hemolínfa de *Grammostola sp* durante o Verão e o Inverno. Notadamente, durante o período de Verão a concentração de glicose na hemolínfa está aumentada 2,7 vezes em relação ao Inverno.

A concentração de glicogênio no hepatopâncreas e músculo de *Grammostola sp* durante o Verão e o Inverno é mostrada na figura 14. Durante o verão a *Grammostola sp*. mantém as concentrações de glicogênio tecidual 8,5 vezes mais elevadas do que durante o período de Inverno

DISCUSSÃO

O metabolismo intermediário em aranhas ou outros aracnídeos é muito pouco estudado e também pouco se conhece sobre a interconversão dos substratos absorvidos para posterior liberação na circulação.

Trabalhos demonstrando a importância da atividade gliconeogênica em aranhas caranguejeiras (*Grammostola sp*) e suas variações sazonais não foram encontrados na revisão da literatura.

Tem sido sugerido que o hepatopâncreas das aranhas é o principal local para o metabolismo intermediário, assim como encontrado para os insetos no corpo graxo e fígado para mamíferos. De forma geral os nutrientes são absorvidos pelo fígado que desempenha papel central no metabolismo.

Santos e cols, 1988, relatam que em crustáceos o metabolismo energético da glicose apresenta variações determinadas por hormônios, pelo ambiente e por fatores nutricionais.

Clarke e Fraser (2004) evidenciam aspectos importantes na relação entre temperatura e metabolismo relacionando o efeito da temperatura sobre as rotas bioquímicas.

Uma das vias metabólicas que participa na manutenção dos níveis de glicose na circulação é a gliconeogênese, que se caracteriza como uma via que utiliza substratos como aminoácidos, glicerol e lactato para produção de glicose (Lenninguer, 2002).

Segundo estudos de Thompson (1995) realizados com insetos, a contribuição da via gliconeogênica para a manutenção dos níveis de trealose sanguínea não é completamente conhecida. O mesmo autor sugere que o órgão responsável pela realização da gliconeogênese nos insetos é o corpo graxo. Thompson (2000), afirma que a manutenção dos níveis de trealose no sangue através da via gliconeogênica, em *Manduca sexta*, é regulada a longo prazo em resposta a uma dieta pobre em carboidratos.

Em crustáceos, também foram realizados estudos sobre a capacidade gliconeogênica. Nestes animais, Rosas e cols. (2001) identificaram a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) como a enzima chave para a via gliconeogênica no camarão *Litopenaeus vannamei*. Em crustáceos, como o caranguejo *Chasmagnathus granulata* o hepatopâncreas atua como o centro para as funções de metabolismo de carboidratos e local para a gliconeogênese (Oliveira, 97).

Estes autores, também sugerem que em camarões as proteínas sejam utilizadas como fonte de energia, produzindo glicose que é armazenado como glicogênio. Isto ocorre, para satisfazer as necessidades metabólicas em dietas com baixas quantidades de carboidratos. Os resultados apresentados por estes autores sugerem que os camarões possuem uma alta plasticidade na utilização de proteínas como fonte de energia utilizando a via gliconeogênica para a produção de carboidratos.

Experimentos *in vitro* realizados por Oliveira e Da Silva, (1997), demonstraram que o hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* é um órgão importante para os processos da via gliconeogênica. A sugestão de Rosas e cols. (2001), pode ser especulada também para a *Grammostola sp.*

Em experimentos medindo as concentrações de glicose na hemolinfa e glicogênio no hepatopâncreas, foi verificado maior concentração destes carboidratos no período de verão quando a caranguejeira tem a sua disposição uma maior oferta de alimento (observação pessoal). No Inverno, quando a disponibilidade de alimento está diminuída as concentrações glicêmicas e de glicogênio tecidual mostram-se reduzidas (Fig. 13 e 14).

Segundo Rosas e cols. (2000), ao limitar-se o uso de carboidratos na dieta de camarões, eles podem, como estratégia de adaptação metabólica, utilizar proteínas como fonte primária de energia via gliconeogênese. Em relação ao estudo da atividade gliconeogênica em *Grammostola*, os níveis de proteínas e de lipídios, provenientes de uma alimentação estritamente carnívora, possivelmente sejam a principal fonte de substrato para armazenamento tecidual e também para a via gliconeogênica (Porcher e Kucharski , 2003).

Moon, (1988); Kettelhut e cols. (1980), relatam que em vertebrados carnívoros ou alimentados com dieta rica em proteínas, a capacidade gliconeogênica é significativamente maior no estado alimentado com proteínas do que aquela de vertebrados alimentados com dieta rica em carboidratos e pobre em proteínas. Ainda, segundo Kucharski e Da Silva em 1991, estudos tem

demonstrado que *Chasmagnathus granulata* alimentados com dieta rica em proteínas apresentam níveis baixos de glicemia e de glicogênio no hepatopâncreas ao passo que uma dieta de rica em carboidratos estes níveis apresentam-se elevados. Este padrão de ajuste metabólico depende dos níveis de carboidratos e proteínas na dieta.

As figuras 13 e 14 demonstram que as aranhas *Grammostola sp*, apresentaram níveis reduzidos de glicemia e de glicogênio no hepatopâncreas no inverno e no verão caracterizando um animal com dieta de proteínas, quando comparados a animais como caranguejos, peixes, urubus e ratos mantidos com uma dieta rica em carboidratos (Kucharski e Da Silva, 1991; Machado e Cols, 1989; Brito e Cols, 2001; Migliorini e Cols, 1973).

Entretanto observa-se que estes níveis se tornam significativamente reduzidos no inverno onde o aporte de alimento praticamente se reduz a zero. Esta aranha é estritamente carnívora, caçando insetos ou mesmo pequenos vertebrados para sua alimentação. Uma adaptação à insetivoria nas aranhas foi demonstrada por Han e cols em 2004. Este autor faz referencia a presença de genes para a síntese de quitinase no corpo graxo de *Araneus ventricosus*, essa enzima seria responsável pela digestão do exoesqueleto quitinoso dos insetos, este fato favoreceria a utilização destes animais na alimentação das aranhas (Bücherl, 1951).

Barron, (1999), afirma que a glicose é o principal monossacarídeo presente na hemolínfa de aranhas. Embora existam trabalhos sobre biologia, endocrinologia

reprodutiva e estudos da ação dos venenos produzidos pelas aranhas, o conhecimento sobre o metabolismo é muito limitado. Igualmente trabalhos demonstrando a importância das variações sazonais sobre o metabolismo também são escassos. Especialmente em relação da atividade da via gliconeogênica em aranhas caranguejeiras (*Grammostola sp.*).

Punzo (1992) identificou os aminoácidos prolina e alanina como os mais abundantes na hemolinfa de aranhas do gênero *Lycosa*. A *Grammostola sp.*, segundo os resultados apresentados nas figuras 7 e 8, demonstra uma capacidade intrínseca do hepatopâncreas de converter [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose indicando um aumento na atividade gliconeogênica a partir de proteínas no verão. Entretanto, no inverno, a conversão da [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose mostra-se significativamente aumentada somente nos primeiros 5 minutos de incubação, sendo que nos tempos restantes (15, 30 e 120 minutos), a atividade gliconeogênica de conversão [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose mostra-se reduzida. Estes resultados indicam que ocorre uma maior incorporação de [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose no verão do que no inverno, assim sugere-se que a atividade gliconeogênica no verão possa estar relacionada a uma maior atividade do animal (observação pessoal), à abundância de alimento na natureza e ao hábito alimentar estritamente carnívoro dos animais pertencentes a este gênero (Bücherel, 1951). No período de inverno, em razão da redução da oferta de alimento e ao hábito de hibernar existe uma significativa redução da conversão da [U-¹⁴C]-L-alanina em ¹⁴C-glicose. Com exceção dos 5 minutos de incubação, onde esse valor foi 1,46

vezes maior do que no verão. Este fato sugere um mecanismo de adaptação voltado à rápida obtenção de energia em períodos de escassez de alimento. Esta estratégia metabólica talvez permita a *Grammostola* dispor de glicose para uma rápida recuperação do estado de torpor disponibilizando quase imediatamente um aporte de glicose a partir de uma dieta de proteínas.

Observam-se valores de conversão do [U-¹⁴C]-L-lactato em ¹⁴C-glicose, podendo-se concluir que o lactato parece não ser o substrato preferencial para a atividade gliconeogênica no verão. A comparação entre os valores relacionados na figura 7 referentes à gliconeogênese a partir de alanina e na figura 11 que se refere a conversão do glicerol, justifica a afirmação acima uma vez que o período de verão é notadamente, uma época de intensa atividade dos componentes da fauna e um período do ano em que as aranhas usam abrigos próximos da superfície e apresentam boa exposição ao oxigênio atmosférico (referência pessoal). A *Grammostola sp.*, parece utilizar-se de vias aeróbicas no período de verão para obtenção de energia a partir da glicose resultante da gliconeogênese. Entretanto no inverno, o perfil metabólico para a gliconeogênese da *Grammostola sp.* apresenta-se com um comportamento contrário ao observado no verão. A atividade de obtenção de glicose a partir do [U-¹⁴C]-L-lactato está aumentada no inverno na razão de 5,7 e 5,3 vezes para os tempos de 15 e 120 minutos, respectivamente, em relação ao verão sendo significativo o aumento da incorporação do [U-¹⁴C]-L-lactato em glicose aos 15 minutos em relação aos demais tempos de incubação. Esta relação entre a gliconeogênese a partir do

lactato no verão e no inverno permite inferir que a aranha caranguejeira, no inverno, não realiza ou realiza raras incursões ao ambiente, mantendo-se abrigada em tocas relativamente profundas e, provavelmente, com baixa concentração de oxigênio. Este comportamento poderá induzir a uma hipóxia tecidual, assim seria utilizada a via anaeróbica para produção de energia a qual por sua vez tem como produto o lactato. Provavelmente este lactato possa novamente ser reconvertido a glicose através da gliconeogênese.

Em oposição ao relatado para as concentrações glicêmicas e teciduais de glicogênio, os lipídios totais parecem ser uma importante fonte de energia a disposição da *Grammostola sp.* tanto no verão quanto no inverno pois apresentam valores elevados nas duas estações (Porcher e Kucharski ,2002 ;2003).

Desta forma a metabolização dos lipídios gera como produtos ácidos graxos e glicerol, o qual pode ser utilizado pela via gliconeogênica.

Em *Grammostola sp.* observa-se que a atividade de conversão do [U-¹⁴C]-L-glicerol em glicose mantém-se aproximadamente estável tanto no verão quanto no inverno, como é possível observar nas figuras 11 e 12, inclusive o perfil das curvas da atividade gliconeogênica permanece semelhante. O tempo de incubação de 15 minutos demonstra que a conversão de [U-¹⁴C]-L-glicerol em glicose é significativamente reduzido em relação aos demais tempos estudados, neste tempo de incubação a gliconeogênese a partir de glicerol é inferior aos demais tempos tanto no verão quanto no inverno. No verão, ao tempo de 120 minutos de incubação, ocorre o maior valor de conversão do [U-¹⁴C]-L-glicerol em glicose,

entretanto, no inverno o maior valor de conversão do [U-¹⁴C]-L-glicerol dá-se aos 60 minutos de incubação. Sugere-se que estas alterações, nos níveis de conversão do [U-¹⁴C]-L-glicerol em glicose, possam estar relacionadas à reduzida oferta de alimento no período de inverno ou na capacidade de mobilização das reservas lipídicas no inverno quando comparada ao verão. Por ocasião da metabolização de lipídios no período de inverno, a conversão de glicerol em glicose é otimizada com a redução do tempo de conversão pela via gliconeogênica.

Provavelmente durante os meses quentes (verão) os lipídios são oxidados em maior proporção reduzindo a necessidade de utilização da via gliconeogênica para produção de glicose. pois se observa uma redução na capacidade gliconeogênica. No inverno esta via passa ter uma importância maior já que o animal esta em hibernação e a oxidação de substratos fica reduzida e desta forma a gliconeogênese seria a principal fonte de carboidratos para manutenção do animal durante este período de inatividade.

Através dos valores médios obtidos, para cada um dos três substratos utilizados pela via gliconeogênica, parece existir uma diferença na capacidade de utilização destes substratos entre o inverno e o verão. Assim durante o inverno no hepatopâncreas de *Grammostola sp.* podemos evidenciar no hepatopâncreas que os substratos preferencialmente utilizados por esta via, em função dos níveis de glicose produzidos, são o lactato e o glicerol e posteriormente a alanina. Entretanto no verão encontra-se uma inversão nos substratos utilizados pela via gliconeogênica, onde a alanina e o glicerol seriam utilizados preferencialmente e

posteriormente o lactato. Pode-se observar que apesar das alterações sazonais quanto à preferência pelos substratos o glicerol foi sempre um substrato importante. Este fato se deve provavelmente aos elevados níveis de lipídios que são encontrados no hepatopâncreas e hemolínfa tanto no inverno como no verão (Porcher e Kucharski ,2002 ;2003).

A gliconeogênese no hepatopâncreas, parece ser uma via metabólica de importância para as caranguejeiras fazendo a manutenção dos níveis glicêmicos, pois de maneira geral as reservas teciduais de glicogênio encontram-se reduzidas tanto no inverno quanto no verão (Porcher e Kucharski ,2002 ;2003). Essa via metabólica disponibiliza energia imediata para o consumo e/ou para armazenamento de carboidratos.

O presente trabalho demonstra, pela primeira vez, a presença da via gliconeogênica em aranhas de gênero *Grammostola*. Assim como, uma variação dos substratos preferenciais nos períodos de verão e de inverno.

FIGURAS

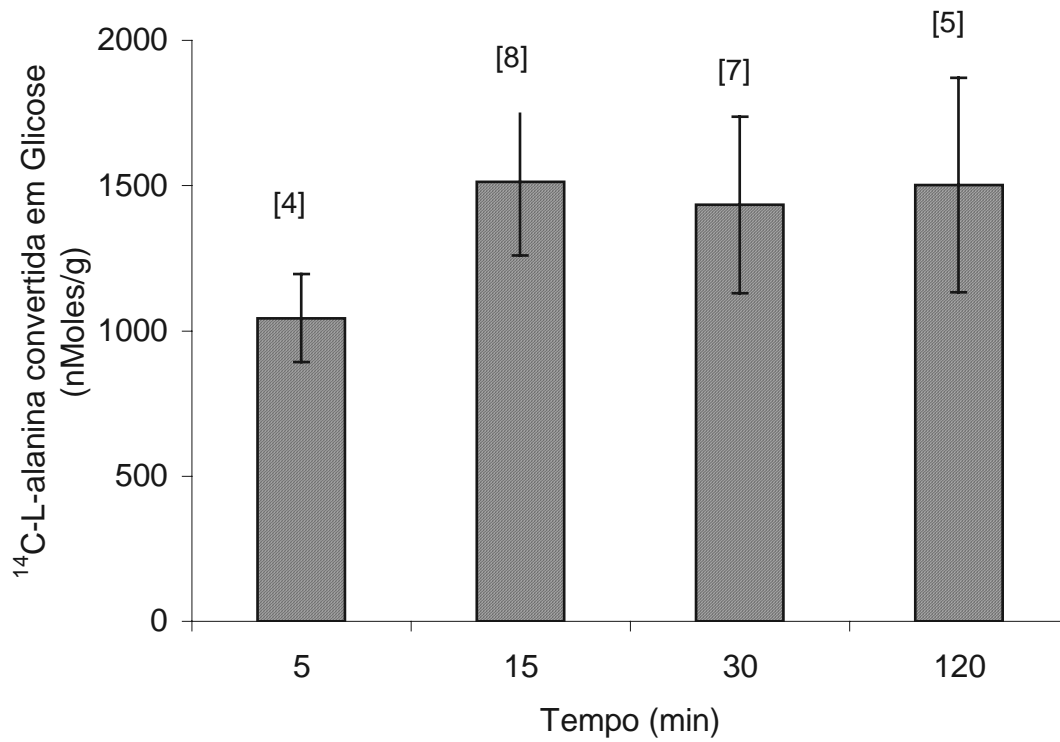


Figura. 7. Atividade gliconeogênica do hepatopâncreas de *Grammostola sp.*, incubado com [U-¹⁴C]-L-alanina em diferentes tempos, durante o verão. Os dados estão representados como média ± SD. O número amostral está representada entre colchetes.

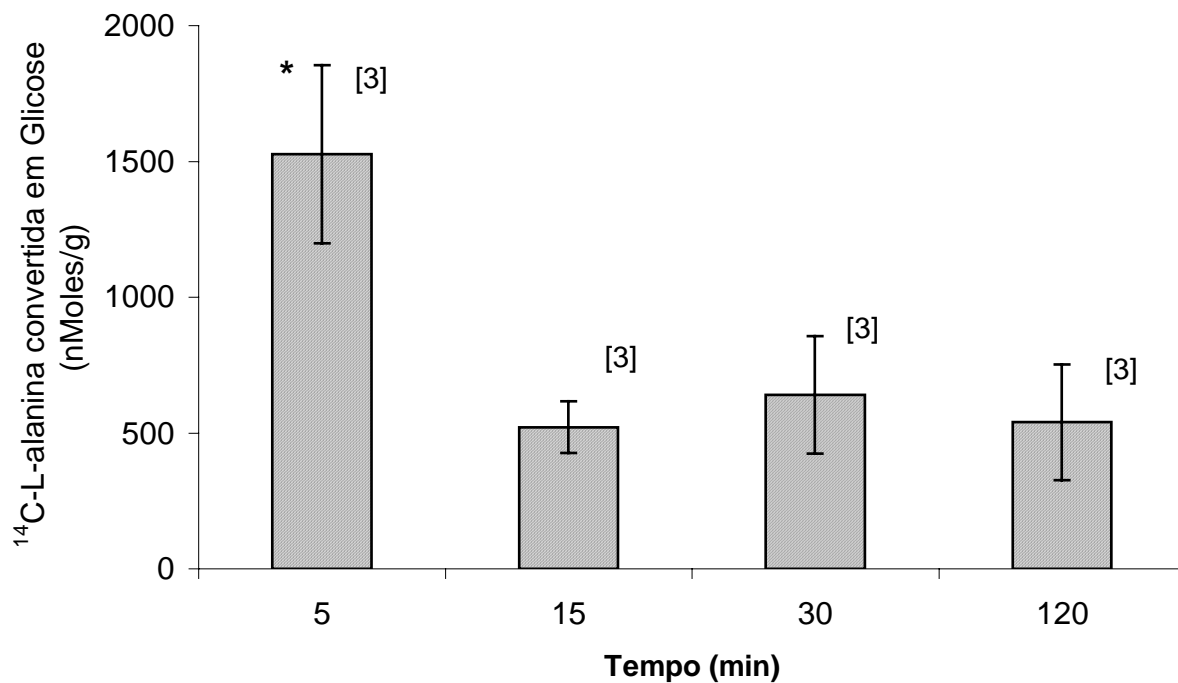


Figura 8. Atividade gliconeogênica do hepatopâncreas de *Grammostola sp.*, incubado com [U-¹⁴C]-L-alanina em diferentes tempos, durante o inverno. Os dados estão representados como média ± SD. O número amostral está representado entre colchetes. O asterisco representa diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos outros tempos de incubação.

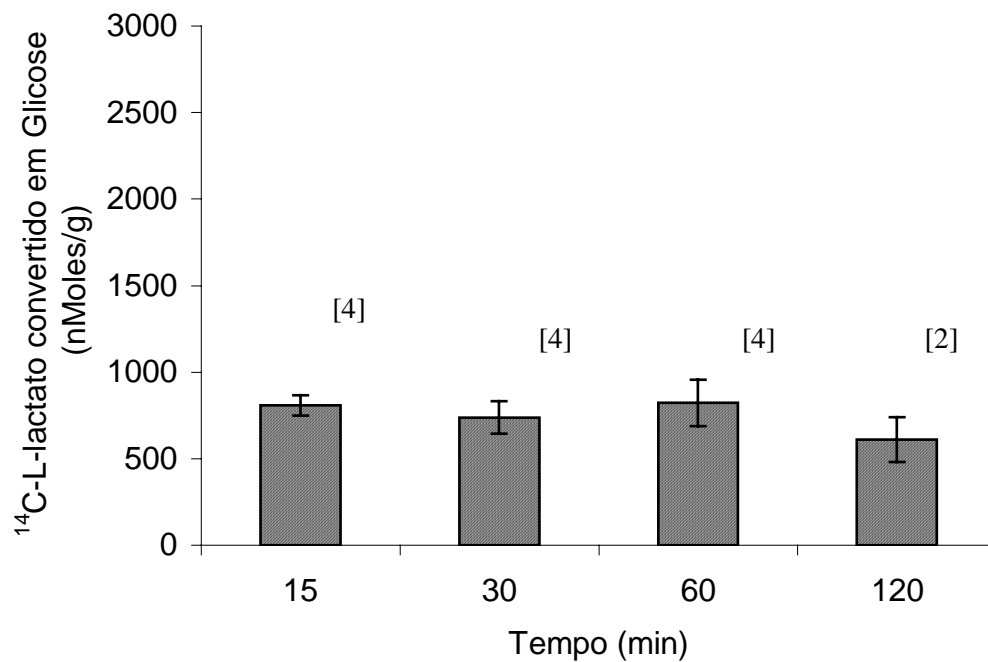


Figura 9. Atividade gliconeogênica do hepatopâncreas de *Grammostola sp.*, incubado com [U- ^{14}C]-L-lactato em diferentes tempos, durante o verão. Os dados estão representados como média \pm SD. O número amostral está representado entre colchetes.

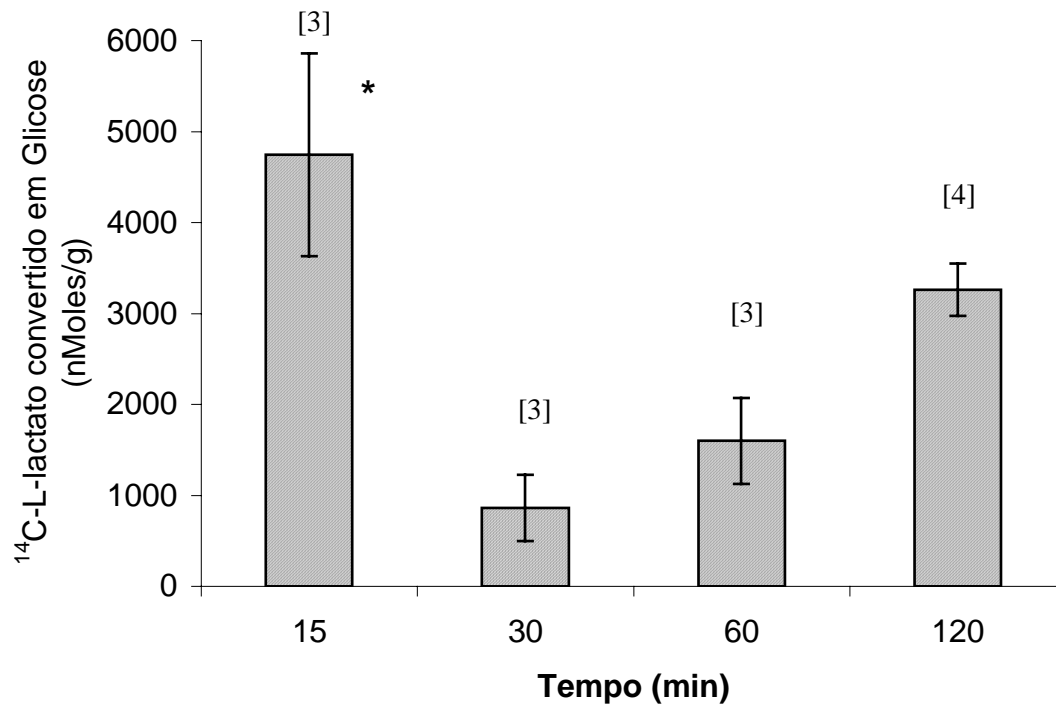


Figura 10. Atividade gliconeogênica do hepatopâncreas de *Grammostola sp.*, incubado com [U- ^{14}C]-L-lactato em diferentes tempos, durante o inverno. Os dados estão representados como média \pm SD. O número amostral está representado entre colchetes. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos outros tempos de incubação.

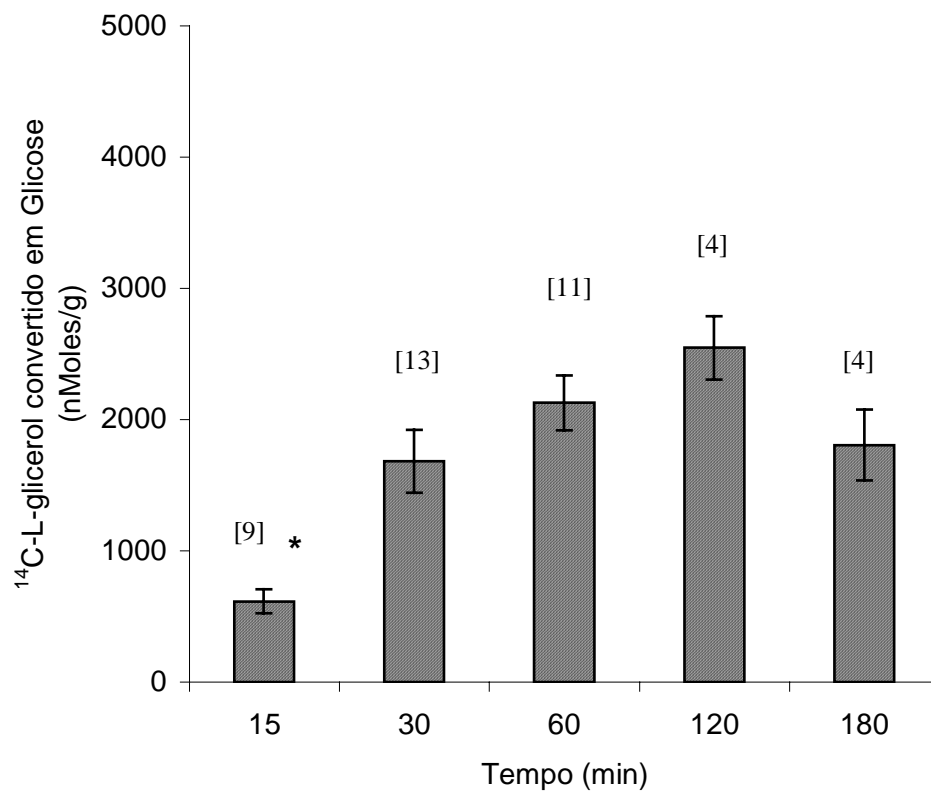


Figura 11. Atividade gliconeogênica do hepatopâncreas de *Grammostola sp.*, incubado com [U-¹⁴C]-L-glicerol em diferentes tempos, durante o verão. Os dados estão representados como média ± SD. O número amostral está representado entre colchetes. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação aos outros tempos de incubação.

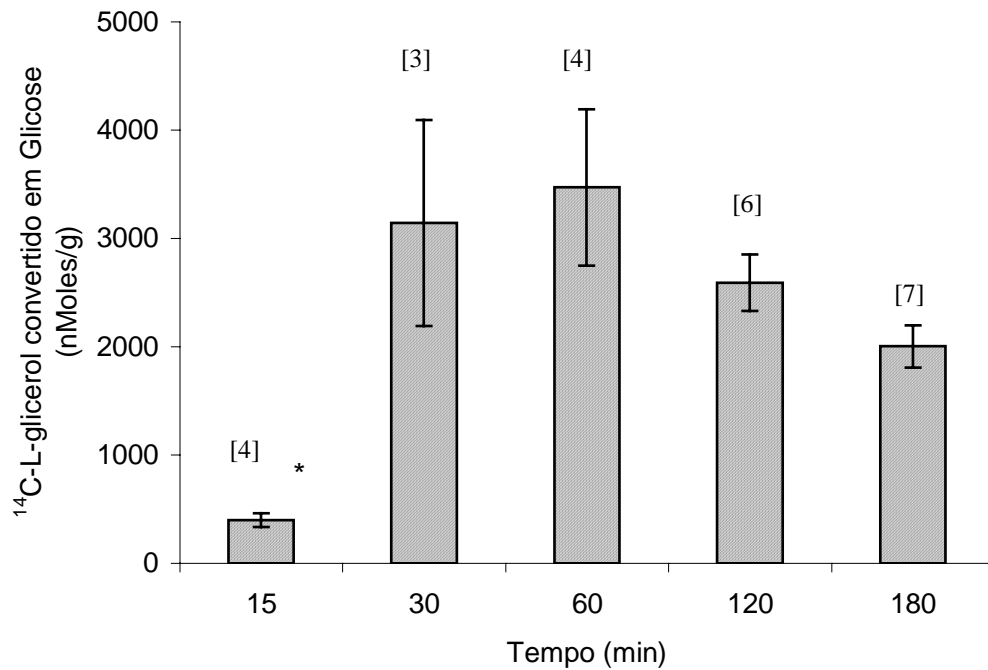


Figura 12. Atividade gliconeogênica do hepatopâncreas de *Grammostola sp.*, incubado com [U-¹⁴C]-L-glicerol em diferentes tempos, durante o inverno. Os dados estão representados como média ± SD. O número amostral está representado entre colchetes. O asterisco representa a diferença significativa (P < 0,05) em relação aos outros tempos de incubação.

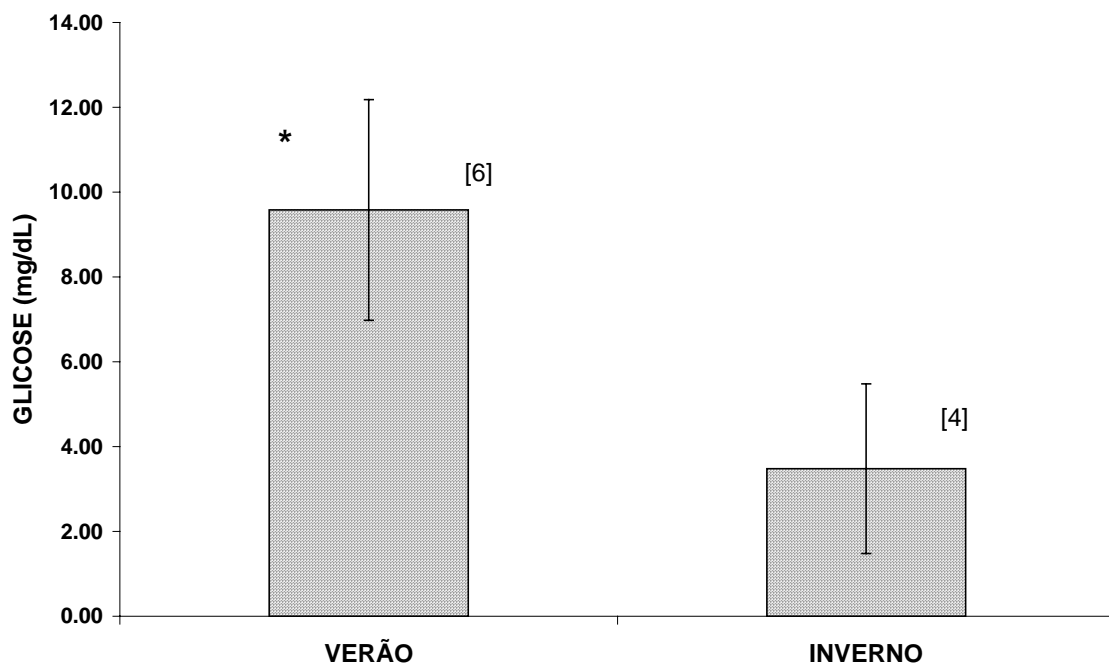


Figura 13. Concentração de glicose na hemolínfa de *Grammostola sp* durante o Verão e o Inverno. Os dados estão representados como média \pm SD. O número amostral está representado entre colchetes. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao inverno.

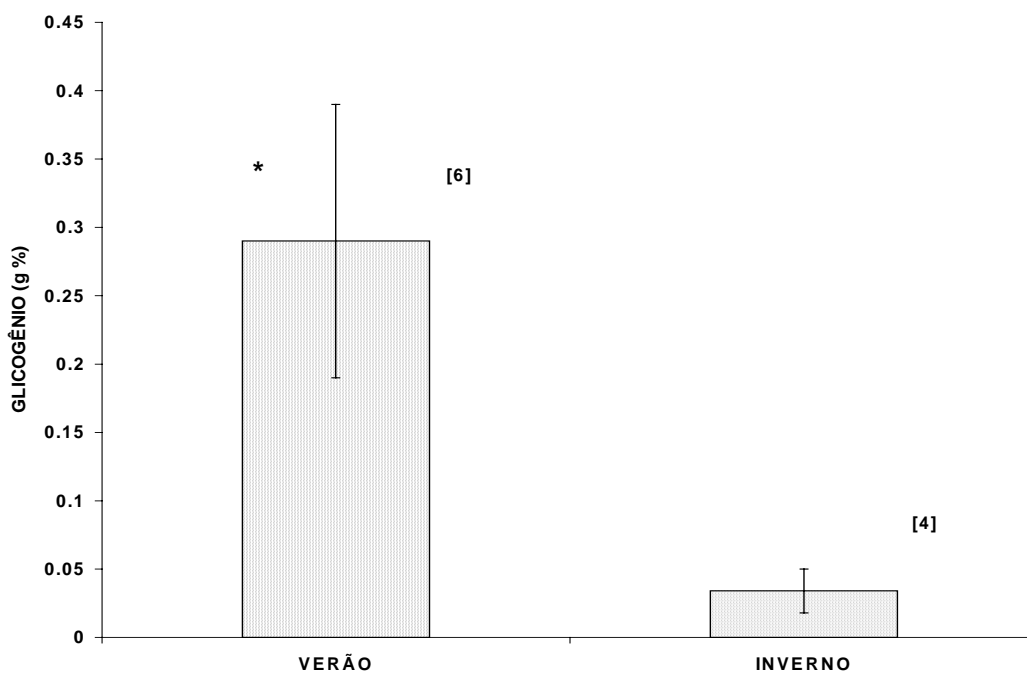


Figura 14. Concentração de glicogênio no hepatopâncreas de *Grammostola sp* durante o Verão e o Inverno. . Os dados estão representados como média \pm SD. O numero amostral esta representado entre colchetes. O asterisco representa a diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao inverno.

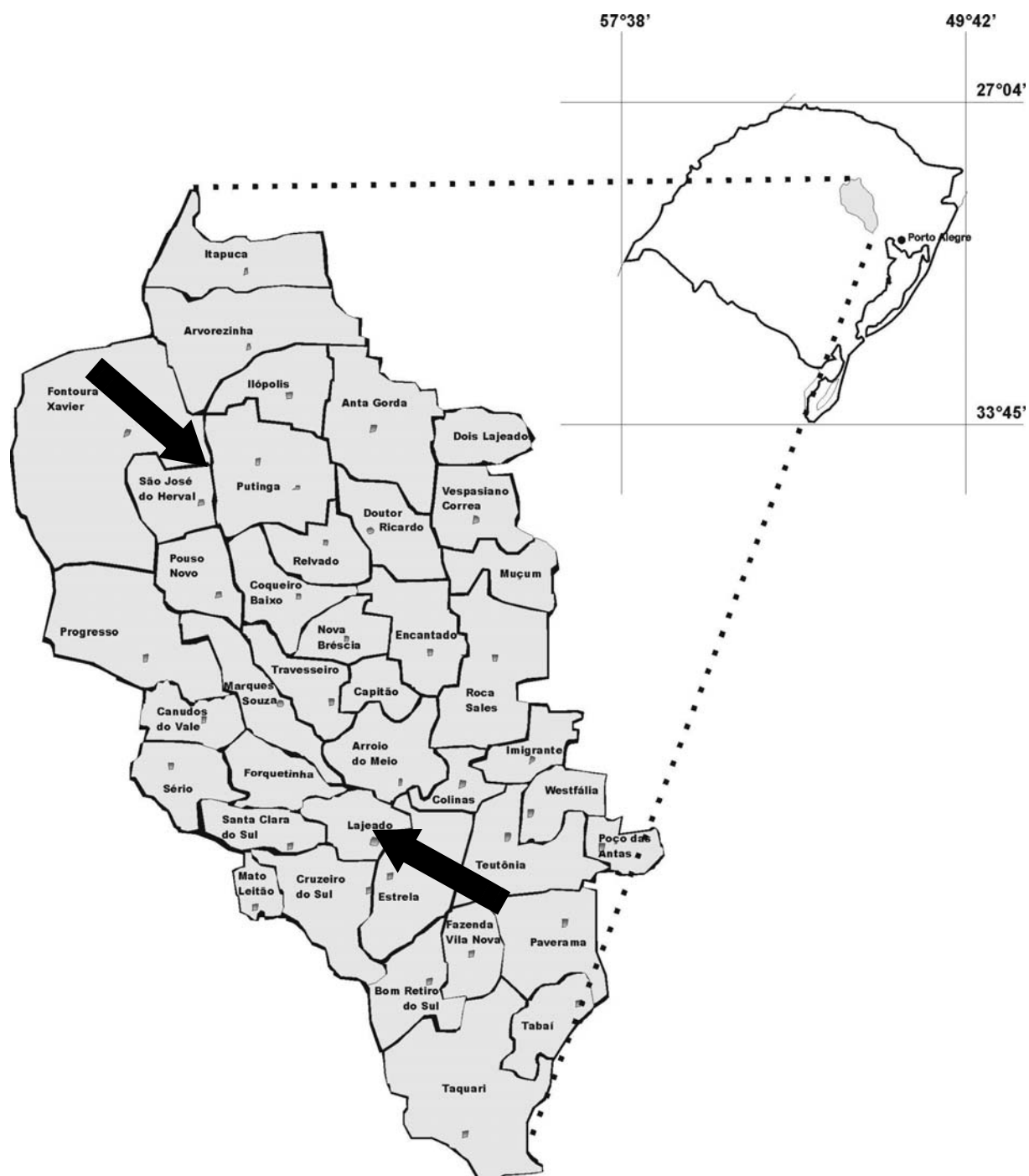
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker, N., Huebotter, R. J., Schotz, M. C., 1965. Analysis of glucose – ¹⁴C in tissues using thin-layer chromatography. *Analytical Biochemistry*, 10: 222-235.
- Barron, P. D., 1999. Carbohydrate analysis in spider hemolymph of selected lycosid and araneid spiders (Araneae: Lycosidae and Araneidae). *The J. of Aracnology*. 27: 550-552.
- Brito, S. R. C., Moura, M. A. F., Kawashita, N. H., Brito, M. N., Kettelhut, I. C. Migliorini, R. H., 2001. Glucose Uptake and Glycolytic Flux in adipose tissue from rats adapted to a High-Protein, carbohydrate-free diet. *Metabolism-Clinical and Experimental*. 50 (10): 1208 – 1212.
- Bücherl, W., 1951. Estudos sobre a biologia e a sistemática do gênero GRAMMOSTOLA Simon, 1892. Monografias do Instituto Butantan.
- Clarke, A. and Fraser, P. P., 2004. Why does metabolism scale with temperature? *Functional Ecology*. 18: 243-251.
- Geary, N.; Langhans, W.; Scharrer, E. 1981. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression of feeding in the rat. *Am. J. Physiol.*, 241(10): R330-335.
- Han, J. H., Lee, K. S., Li, J., Kim, J., Je, Y. H., Kim, D. H., Sohn, H. D., Jin, B. R., 2004. Cloning and expression of a body-specific chitinase cDNA from the spider, *Araneus ventricosus*, *Comp. Biochem. Physiol*, B. xx: 1-9.
- Hochachka, P.W. & Lutz, P.L., 2001. Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol*. B130:435-459.
- Kettelhut, I. C., Foss, M. C. and Migliorini, R. H., 1980. Glucose homeostasis in a carnivorous animal (cat) and rats fed a high-protein diet. *Am. J. Physiol*. 239: 437-444.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M. 1991b. Seasonal Variation in the energy metabolism in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. *Comp. Biochem. Physiol*. 100A (3):599 – 602.
- Leningher, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M., 2002. Principles of Biochemistry, 3^aed. New York: Worth Publisher.
- Lutz, P.L. & Storey, K.B., 1997. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: *Handbook of Physiology – Comparative Physiology*. Dantzler, W.H. (ed.), Oxford: American Physiological Society, vol. II.

- Machado, C. R., Garofalo, M. A. R., Roselino, J. E. S. Kettelhut, I. C., Migliorini, R. H. 1989. Effect of Fasting on Glucose-Turnover in a Carnivorous Fish (*Hoplias* sp). *Am. J. Physiol.* 256(3): R612 - R615.
- Migliorini, R. H., Linder, C., Moura, J. L., Veiga, J. A. S. 1973. Gluconeogenesis in a Carnivorous Bird (Black-Vulture). *Am. J. Physiol.* 225 (6): 1389-1392.
- Moon, T. W. (1988). Adaptation, constraint, and the function of the gluconeogenic pathway. *Can. J. Zool.* 66, 1059-1068.
- Oliveira, G. T., 1993. Estudo in vitro da Gliconeogênese no hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae). Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Fisiologia) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Oliveira, G. T. and Da Silva, R. S. M., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 118 A, 1429-1435.
- Porcher, R. D. e Kucharski, L. C. R., 2002. Variação sazonal das reservas energéticas da aranha caranguejeira *Grammostola* sp. (Araneida – Mygalomorphae). In: XVII FeSBE. Salvador, BA.
- Porcher, R. D., Kucharski, L. C., et al. , 2003. Avaliação das reservas enrgeticas da aranha caranguejeira *Grammostola* sp (Araneida - Mygalomorphae) durante o inverno e o verão. In: IV Encontro de Aracnologos do Cone Sul, Sao Paulo.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S. M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp. Biochem. Physiol.*, B127, 375-381.
- Punzo, F., 1982. Hemolymph Chemistry of Lycisid Spider. *Comp. Biochem. Physiol*, 71 B N° 4, 703-707.
- Rathmayer, W., 1964. Neuromuscular transmission in a spider and the effect of calcium. *Comp. Biochem. Physiol*, 14: 673-687.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Arena L., Lemaire, P., Soyez, C., and Van Wormhoudt A., 2000. Influence of dietary carbohydrates on the metabolism of juveniles *Litopenaeus stylirostris*. *J Exp Mar Biol Ecol* 249:181 - 198.
- Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Le Priol, Y., Pascual C., Rossignol, G., Contreras, F. Sanchez, A., and Van Wormhoudt A., 2001. Metabolism and Growth of Juveniles of *Litopenaeus vannamei* effect of salinity and dietary carbohydrates levels. *J Exp Mar Biol Ecol* 259:1 - 22.

- Santos, E.A.; Nery, L.E. M.; Manzone, G.C., 1988. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, rapsidade). *Comp. Biochem. Physiol.* A89, 329-332.
- Thompson, S. N., 1995. Gluconeogenesis and effect of nutritional status on TCA cycle in the insect, *Manduca Sexta* L. *Biochemical and Biophysical Acta* 1245: 376-384.
- Thompson, S. N., 2000. Pyruvate cycling and implications for regulation of gluconeogenesis in the insect, *Manduca Sexta* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274: 787-793.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. *Anal. Biochem.* 11, 226-265.

Anexo 1



Anexo 1: Mapa do Vale do Taquari. As Setas Indicam os locais de coleta.

Anexo 2

Variação climática anual no Vale do Taquari, dados obtidos referentes ao ano de 2003

Mês	Temperatura (°C)		Mínim a	Precipitação pluviométrica total (mm)	Dias de precipitação o (n°)	Velocidade média do vento (Km/h)	Umidade média (%)
	Média	Máxima					
Jan	25,6	36,7	15,1	133,9	6	5,1	72
Fev	25,1	38,3	15,8	325,0	19	4,3	76
Mar	23,5	37,1	12,9	83,2	12	3,7	77
Abr	20,5	32,1	8,2	116,4	7	4,0	76
Mai	18,0	30,3	5,6	44,3	5	2,7	76
Jun	17,6	27,6	9,1	145,4	8	4,1	84
Jul	14,6	31,2	0,2	188,0	16	3,6	80
Ago	14,7	32,6	4,5	61,7	10	4,3	71
Set	16,6	34,9	4,2	66,0	15	4,8	74
Out	20,3	36,2	6,7	218,7	13	5,4	74
Nov	22,1	35,7	10,2	152,7	10	5,6	69
Dez	22,5	33,8	11,5	327,9	12	5,4	71

Anexo 3

CLASSIFICAÇÃO SISTEMÁTICA

Phylum Arthropoda

Subphylum Chelicerata

Classis Arachnida

Ordo Araneae

Subordo Opisthothelae

Infraordo Mygalomorphae

Familia Thomisidae

GENUS *Grammostola*

Anexo 4

Guide for Authors

COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY

Aims and scope of CBP

The journal publishes original articles emphasizing comparative and environmental aspects of the physiology, biochemistry, molecular biology, pharmacology, toxicology and endocrinology of animals. Adaptation and evolution as organizing principles are encouraged. Studies on other organisms will be considered if approached in a comparative context.

Part A. Molecular and Integrative Physiology deals with molecular, cellular, integrative, and ecological physiology. Topics include bioenergetics, circulation, development, excretion, ion regulation, endocrinology, neurobiology, nutrition, respiration, and thermal biology. Studies on regulatory mechanisms at any level or organization such as signal transduction and cellular interactions and control of behaviour are encouraged.

Part B. Biochemistry and Molecular Biology covers biochemical and molecular biological aspects of metabolism, enzymology, regulation, nutrition, signal transduction, promoters, gene structure and regulation, metabolite and cell constituents, macromolecular structures, adaptational mechanisms and evolutionary principles.

Part C. Toxicology and Pharmacology is concerned with chemical and drug action at different levels of organization, biotransformation of xenobiotics, mechanisms of toxicity, including reactive oxygen species and carcinogenesis, endocrine disruptors, natural products chemistry, and signal transduction. A molecular approach to these fields is encouraged.

Naturally, a certain degree of overlap exists between the different sections, and the final decision as to where a particular manuscript will be published after passing the rigorous review process lies with the editorial office.

Submission and review of manuscripts

All manuscripts (one original plus three copies) must be submitted to the editors: The Editors, CBP Editorial Office, University of British Columbia, 1153 -- 2111 Lower Mall, Vancouver BC, Canada V6T 1Z4.

Authors should provide names and addresses (including phone and fax numbers and e-mail address) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as reviewers. Authors are requested to select an appropriate section and suggest an associate editor of CBP.

Every manuscript is independently reviewed by at least two referees. Rapid turn-around will be encouraged by use of fax and e-mail transmission. Based on these reports, a decision regarding publication, revision or rejection is taken.

Review articles

Before writing their manuscripts, potential authors of review articles should contact one of the Editors who, after consultations with the other editor and/or members of the Editorial Board, will provide feedback on suitability of the topic. Reviews should be topical, and serve as critical appraisals of areas of research. They should provide an up-to-date analysis of concepts and point out future directions. For manuscript preparation, follow the instructions below.

Online submission of papers

Authors are encouraged to submit their manuscripts to the CBP office electronically, by using the ESubmit submission tool at <http://www.elsubmit.com/submit/cbpsubmit>.

After registration, authors will be asked to upload their article and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process.

Full instructions on how to use the online submission tool are available at the above web address.

Colour: Colour figures are published at the author's expense. However, a limited number of colour illustrations may be included, free of charge, at the discretion of the editors.

Revision of manuscripts: Revised manuscripts must be submitted within two months of the authors' receipt of the referees' reports. Otherwise they will be considered as new submissions.

Proofs: The corresponding author will receive proofs by e-mail or post. Proofs must be checked immediately and returned to Elsevier. Corrections to the proofs should be restricted to printer's errors only. Substantial alterations may be charged to the author. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections will not be possible, so please ensure your first sending is complete.

Reprints: The corresponding author will receive twenty five offprints free of charge. Additional offprints may be purchased using the order form accompanying the proofs. **Page charges:** CBP has no page charges.

Preparation of manuscripts

Sections: Manuscripts should be subdivided into the following sections: Title page, abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references, captions to figures, tables.

Format: All sections of the manuscript must be double-spaced with 2.5 cm (1 inch) margins. Pages should be numbered consecutively. Avoid footnotes. Underline only words or letters that will be printed in italics. Mark the position of each figure and table in the margin. The full Latin name of all species used in the study must be supplied.

Title page: The title should be short, concise and informative. Consult a recent issue of CBP for author format. The author's name should be followed by his/her department, institution, city, and country. Indicate the author to whom correspondence and proofs should be addressed, and supply full postal address as well as phone and fax numbers, and an e-mail address. Please provide a running title of not more than 45 characters. If submitting a review article, write "REVIEW" at the top of the title page.

Abstract: The second page of the manuscript must contain only the abstract and the key words. The abstract should be a single paragraph not exceeding 200 words. Non-standard abbreviations and reference citations should be avoided.

Key words: Up to eight key words, which may or may not appear in the title, should be listed in alphabetical order after the abstract. Only these key words, together with the title, will be used to compile the subject index.

References:

1. All publications cited in the text should be presented in alphabetical order in a list following the text of the manuscript.
2. In the text refer to the author's name and year of publication.
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". In this list names of first authors and all co-authors should be mentioned.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically.
5. The List of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. Names of all authors must be included. Do not use et al. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2000a, 2000b, etc.

Follow the relevant examples below.

References to books, book chapters and journals should be as follows:

Axelsson, M., Farrell, A.P., 1993. Coronary blood flow in vivo in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).

Am. J. Physiol. 264, R963 - 971.

Bond, C.E., 1979. *Biology of Fishes*. Saunders Publ., Philadelphia, PA.

Bowden, L.A., Rainger, G.E., Holland, J.W., Knight, J., Secombes, C.J., Rowley, A.F., 1997. Generation and characterization of monoclonal antibodies against rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*), leucocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 117C, 291 - 298.

Collie, N.L., Ferraris, R.P., 1995. Nutrient fluxes and regulation in fish intestine. In: Hochachka, P.W., Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, vol. 4. *Metabolic Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 221 - 239.

Tables: Tables should be prepared for direct camera copy or clearly typed as follows:

(a) Refer to current tables in the journal, for required spatial layout. If possible, a laser printer with a Times Roman font should be used.

(b) Each table, including heading and legend should be typed on a separate sheet.

(c) Insert heavy rules at the head and foot of each table, and fine rules below column headings.

Italics: Genus and species names, and other words normally italicized, should be typed in italics or underlined. Do not use italics in the references.

Illustrations: Photographs, charts and diagrams are to be referred to as "figs" and should be ordered consecutively.

Computer Disks: CBP uses electronic files for speed and accuracy of production. Authors will receive full instructions on disk types, formatting etc. with the letter of provisional acceptance from the editorial office. If you are not submitting online, please observe the following criteria:

1. Send only hard copies when first submitting your manuscript.
2. The electronic file should include all textural material (text, references, tables, figure captions, etc.). Use separate illustration files, if available.
3. The file should use the wrap-around end-of-the-line feature, i.e., returns at the end of paragraphs only. Place two returns after every element such as title headings, and paragraphs.
4. Make sure the disk does not contain a virus.
5. Keep a back-up disk for reference and safety.

Authors in Japan please note: Upon request, Elsevier Science K.K. will provide authors with a list of people who can check and improve the English of their paper (before submission). Please contact our Tokyo Office: Elsevier Science K.K., 9-15 Higashi-Azabu 1-chrome, Minato-ku, Tokyo 106-0044, Japan. Tel.: +81-3-55615032; Fax: +81-3-55615045; e-mail: info@elsevier.co.jp

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking:

DNA sequences and GenBank Accession numbers: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Summary of requirements

1. Submit four (4) copies of the manuscript - one containing the original artwork, plus three copies. Reduce volume by using two-sided print for the three copies. Suggest the appropriate section of CBP and associate editor.
2. Double-space everything everywhere, leaving 1 inch (2.5 cm) margins.
3. Designate the corresponding author and provide telephone and fax numbers, and an e-mail address.
4. Include a running title of less than 45 letters and spaces.
5. Provide an abstract of less than 200 words; append up to eight key words to the abstract page.
6. Check the style in which references are cited; unpublished work will not be listed in this section unless it is "in press".
7. If referencing manuscripts "in press", enclose two copies each of these manuscripts if considered critical to the refereeing process.
8. Provide names and addresses (including phone and fax numbers & e-mail addresses) of at least four researchers of recognized competence who may be considered as referees.

Author enquiries

Visit the Author Gateway from Elsevier Science (<http://authors.elsevier.com>) for the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. The Author Gateway also provides detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided when an article is accepted for publication, by Elsevier.