

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

ESTRESSE OSMÓTICO:
PROTEÍNAS DE ESTRESSE E BALANÇO OXIDATIVO EM *Neohelice granulata*
(CRUSTACEA, DECAPODA, VERONIDAE)

Felipe Amorim Fernandes

Porto Alegre, Dezembro de 2010.

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

ESTRESSE OSMÓTICO:
PROTEÍNAS DE ESTRESSE E BALANÇO OXIDATIVO EM *Neohelice granulata*
(CRUSTACEA, DECAPODA, VERONIDAE)

Felipe Amorim Fernandes

Orientadora

Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Co-orientador

Dr. Luiz Carlos Kucharski

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

Porto Alegre, Dezembro de 2010.

Esta Tese é dedicada a:
Minha mulher Bibiana e ao meu
filho Gabriel que em tão pouco
tempo me ensinaram tanto sobre
o amor.

“Se seus sonhos estiverem nas nuvens, não se preocupe, pois eles estão no lugar certo; agora construa os alicerces” (Autor desconhecido)

“Tudo que se passa no onde vivemos é em nós que se passa. Tudo que cessa no que vemos é em nós que cessa” (Fernando Pessoa)

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein)*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Roselis Silveira Martins da Silva, que sempre demonstrou acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente por me dar a oportunidade de enriquecer meu conhecimento.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Kucharski agradeço por ter me brindado com suas sugestões e colaborações no trabalho.

A Dra. Adriane Belló-Klein por ter aberto o Laboratório de Fisiologia Cardiovascular para que eu realizasse as medidas de formação de peróxido e glutathiona, bem como, a M.Sc. Francisca Mosele e ao Dr. Alex Sander Araujo pelo auxílio nos experimentos;

Ao Dr. Edson Capp e ao doutorando Gustavo Dias Ferreira do Laboratório de Endocrinologia e Obstetrícia pelo auxílio nos experimento de expressão das proteínas de choque térmico;

A Dra. Guendalina Turcato Oliveira por ter aberto o Laboratório de Fisiologia Comparada para que eu realizasse as medidas de atividade da catalase e da $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, bem como, a doutoranda Bibiana Kaiser Dutra pelo auxílio nos experimentos;

Em especial aos colegas do meu laboratório (LaMEC) pela alegre convivência, sendo que alguns destes foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado!

A todos os professores da Pós-graduação em Fisiologia pelo convívio e aprendizado;

As secretárias do Curso de Pós-graduação em Fisiologia que sempre se empenharam em resolver problemas com muita eficiência e paciência. Obrigado!!!

Aos amigos que sempre torcem por mim;

Aos meus familiares que sempre me apoiaram. Aos meus pais, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo;

A meu filho Gabriel que traz tanta luz e gosto para minha vida, um amor especial;

Agradeço principalmente a minha companheira e mulher Bibiana Kaiser Dutra pelo amor, dedicação, companheirismo, trabalho, etc. Nenhuma pessoa fará tanto por mim. Te amo;

Agradeço Também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de doutorado;

Por fim, agradeço a todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este trabalho fosse executado com êxito;

E finalmente a Deus por sempre me iluminar e me guiar.

RESUMO

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi determinar o efeito do estresse hiperosmótico ou hiposmótico, *in vivo*, sobre o balanço oxidativo, os níveis de atividade de $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ e a s expressões das Hsp 70 e 90 em *Neohelice granulata*. O peso seco das brânquias anteriores, brânquias posteriores, hepatopâncreas e músculo mandibular foram determinados em diferentes tempos experimentais (15, 30, 45, 60 e 360 minutos) e escolhidos os tempos de 1 e 6 horas de estresse. Entre os grupos controles foi o hepatopâncreas o tecido que apresentou maior concentração de peróxido de hidrogênio. As brânquias anteriores e posteriores, o hepatopâncreas reduziram significativamente a formação de peróxido de hidrogênio após 1 e 6 horas de estresse hiposmótico ou hiperosmótico. No músculo mandibular, foram verificados valores significativamente menores de peróxido de hidrogênio em ambos os estresses, exceto após 1 hora de estresse hiperosmótico. Nas brânquias anteriores e posteriores foi verificada uma diminuição na relação da glutathiona oxidada/reduzida após uma hora em ambos os estresses. Após 6 horas de estresses, as brânquias posteriores e brânquias anteriores apresentaram uma relação de glutathiona oxidada/reduzida mais elevada que o controle. Mesmo padrão de resposta foi verificado no hepatopâncreas e músculo mandibular. A atividade da catalase nas brânquias anteriores apresentou-se significativamente mais elevada, em ambos os tempos, nos dois estresses, enquanto nas brânquias posteriores apenas após 6 horas foi encontrado um aumento significativo da atividade. No hepatopâncreas a atividade da catalase no estresse hiposmótico diminuiu significativamente após 6 horas de estresse, enquanto no estresse hiperosmótico foi verificada uma diminuição significativa da atividade da catalase em ambos os tempos experimentais. O músculo mandibular apresentou uma diminuição significativa da catalase somente após uma hora de estresse hiperosmótico. Quanto à atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, esta apresentou-se diminuída em todos os tecidos estudados após

a submissão dos animais aos diferentes estresses em ambos os tempos. Alterações na expressão da Hsp 70 foram verificadas apenas nas brânquias posteriores, a expressão desta proteína foi significativamente maior no estresse hiposmótico quando comparada ao grupo controle. Ao final deste trabalho pode-se concluir que o caranguejo *N. granulata*, no período inicial de aclimatação às alterações de salinidade, possui respostas coordenadas de seus sistemas de defesas antioxidantes como estratégias para minimizar ou evitar os danos do choque osmótico. Os resultados também demonstraram que o sistema antioxidante do animal pode ser modulado durante o estresse oxidativo, contudo, a capacidade de modulação não é padronizada, sendo tecido-específica. Outra estratégia utilizada por este caranguejo em resposta ao estresse osmótico curto é uma diminuição da atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase, reduzindo o consumo celular de ATP. A Hsp 70 aumenta somente nas brânquias posteriores, confirmando a afirmação de Chang (2005), que os tecidos não respondem uniformemente a um determinado estresse. No caso do estresse osmótico cabe às brânquias posteriores uma resposta protetora devido à função de principal órgão regulador iônico nos crustáceos.

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias de regulação do volume celular.....	21
Figura 2: Modulação de volume celular por hormônios e aminoácidos.....	22
Figura 3: Alterações na concentração de aminoácidos intracelulares.....	23
Figura 4: Modelo de epitélio branquial.....	29
Figura 5: Formação de EAO.....	36
Figura 6: Balanço oxidativo	38
Figura 7: Mecanismo de indução da expressão das HSPs por estresse.....	47
Figura 8: Estuário de Tramandaí- RS.....	55
Figura 9: Hábitat de <i>Neohelice granulata</i>	56
Figura 10: Conteúdo de água (%) nos tecidos	58
Figura 11: A - Animal anestesiado e hemi-dissecado. B - Tecidos excisados.....	60
Figura 12: Níveis de peróxido de hidrogênio formado nas brânquias anteriores de <i>Neohelice granulata</i>	69
Figura 13: Níveis de peróxido de hidrogênio formado nas brânquias posteriores de <i>Neohelice granulata</i>	71
Figura 14: Níveis de peróxido de hidrogênio formado no hepatopâncreas de <i>Neohelice granulata</i>	73
Figura 15: Níveis de peróxido de hidrogênio formado no músculo mandibular de <i>Neohelice granulata</i>	75
Figura 16: Níveis de peróxido na água dos aquários.....	76
Figura 17: Relação glutaciona oxidada e reduzida nas brânquias anteriores de <i>Neohelice granulata</i>	78
Figura 18: Relação glutaciona oxidada e reduzida nas brânquias posteriores de <i>Neohelice granulata</i>	80
Figura 19: Relação glutaciona oxidada e reduzida nas hepatopâncreas de <i>Neohelice granulata</i>	82

Figura 20: Relação de glutathiona oxidada e reduzida no músculo mandibular de <i>Neohelice granulata</i>	84
Figura 21: Atividade da catalase nas brânquias anteriores de <i>Neohelice granulata</i>	86
Figura 22: Atividade da catalase nas brânquias posteriores de <i>Neohelice granulata</i>	88
Figura 23: Atividade da catalase no hepatopâncreas de <i>Neohelice granulata</i>	90
Figura 24: Atividade da catalase no músculo mandibular de <i>Neohelice granulata</i>	92
Figura 25: Atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase nas brânquias anteriores de <i>Neohelice granulata</i>	94
Figura 26: Atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase nas brânquias posteriores de <i>Neohelice granulata</i>	96
Figura 27: Atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase no hepatopâncreas de <i>Neohelice granulata</i>	98
Figura 28: Atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase no músculo mandibular de <i>Neohelice granulata</i>	100
Figura 29: Expressão de Hsp 70 e 90 nas brânquias anteriores de <i>Neohelice granulata</i>	102
Figura 30: Expressão de Hsp 70 e 90 nas brânquias posteriores de <i>Neohelice granulata</i>	104
Figura 31: Expressão de Hsp 70 e 90 no hepatopâncreas de <i>Neohelice granulata</i>	106
Figura 32: Expressão de Hsp 70 e 90 no músculo mandibular de <i>Neohelice granulata</i>	108

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem
 $[^{14}\text{C}]$ – carbono 14
 $^{\circ}/_{00}$ – partes por mil
ATP – adenosina trifosfato
C – Celsius
Ca²⁺ - cálcio
CAT - catalase
Cl⁻ - cloreto
CO₂ – dióxido de carbono
col. – colaboradores
CuZn-SOD - superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DNA – ácido desoxirribonucléico
DnaK, DnaJ, GrpE, GroEl, GroEs - chaperonas moleculares em Procariotos
e - elétron
EAO - espécies ativas de oxigênio
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
Fe-SOD - superóxido dismutase dependente de ferro
Fig. – figura
g – grama
GST - glutathiona S-transferase
h – hora
H⁺ - hidrogênio
H₂O - água
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HCO₃⁻ - bicarbonato
HRPO - peroxidase de rabanete
Hsp - proteínas de choque térmico
Hsp100 - proteína de choque térmico 100 Kilodautons
Hsp60 – proteína de choque térmico 60 Kilodautons
Hsp70 – proteína de choque térmico 70 Kilodautons
Hsp90 – proteína de choque térmico 90 Kilodautons
K⁺ - potássio
KCl – cloreto de potássio
kDa – kilodaltons
KOH – hidróxido de potássio
L - litro
mg – miligrama
MgCl – cloreto de magnésio
min – minuto
ml – mililitro
mM – milimol
Mn-SOD - superóxido dismutase dependente de manganês
Na⁺ - sódio
Na₂P₂O₇ – hidrogênio fosfato de sódio
Na₃VO₄ - ortovanadato de sódio

NaCl – cloreto de sódio
NADPH - ácido nicotinamida dinucleotídeo fosfato
NaF – fluoreto de sódio
NaOH – hidróxido de sódio
NH₄⁺ - amônia
nm – nanômetros
O₂ – oxigênio
O₂⁻ - ânion superóxido
OH⁻ - radical hidroxil
P-ATPase - bombas de prótons das membranas plasmáticas
p/v – peso/volume
ppt – partes por trilhão
PSMF - fenilmetilsulfonil fluoreto
RNA_m - ácido ribonucléico mensageiro
RPM – rotações por minuto
RS – Rio Grande do Sul
RVD - *regulatory cell volume decrease* - volume celular regulatório
RVI - *volume regulatory increase* – aumento regulatório do volume
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Se-GPX - glutationa peroxidase dependente de selênio
TCA – ácido tricloroacético
U – unidades
V-ATPase - bombas de prótons vacuolares
UV-A – radiação ultravioleta A
UV-B – radiação ultravioleta B
VO₂ – volume de oxigênio
μL – microlitros

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo.....	9
Lista de Figuras.....	12
Lista de Abreviaturas.....	14
Introdução.....	20
Hipótese	49
Objetivos.....	51
Objetivo geral.....	52
Objetivo específico.....	52
Metodologia.....	54
Coleta de animais.....	55
Aclimação dos animais.....	56
Procedimentos experimentais.....	57
Escolha dos Tempos Experimentais.....	57
Estresse hiposmótico e Estresse hiperosmótico.....	59
Extração e Preparo dos tecidos.....	60
Preparação dos homogenatos teciduais.....	60
Quantificação da formação de Peróxido de Hidrogênio	61
Determinação da Relação da Glutathiona Oxidada/Glutathiona Reduzida.....	61
Atividade da Catalase.....	62
Preparação das membranas.....	62
Atividade da Na ⁺ /K ⁺ ATPase.....	63

Western Blot das Hsp 70 e 90.....	63
Quantificação das proteínas totais.....	65
Análise Estatística.....	65
Resultados.....	67
Formação de Peróxido.de Hidrogênio.....	68
Relação da Glutaciona Oxidada e Glutaciona Reduzida.....	77
Atividade da Catalase.....	85
Atividade da Na ⁺ , K ⁺ ATPase.....	93
Quantificação das Hsps 70 e 90.....	101
Discussão.....	109
Bibliografia.....	120
Anexos.....	135

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O ESTRESSE OSMÓTICO E AS ALTERAÇÕES NO VOLUME CELULAR

As membranas de células animais, com poucas exceções, são altamente permeáveis à água, porém não toleram grandes pressões hidrostáticas. Portanto, os movimentos da água são em grande parte ditados pelo gradiente de pressão osmótica através da membrana (Häussinger e cols., 2004; Pasantes-Morales e cols., 2006). A homeostase do volume celular não significa volume celular constante. Pequenas mudanças no volume celular acontecem em poucos minutos, e essas variações alteram as funções celulares (Häussinger e cols., 2004).

De acordo com Schmidt-Nielsen (1996), o volume celular e a concentração de solutos de um organismo são usualmente mantidos dentro de limites bastante estreitos, pois desvios substanciais de uma composição relativamente constante e bem definida dos fluidos corporais podem ser incompatíveis com a vida.

Estresse osmótico pode ser definido como alterações do volume celular induzidas pela diferença de concentração de solutos entre os dois lados da membrana plasmática, as quais ativam mecanismos celulares regulatórios de curto e longo prazo.

Estudos realizados com hepatócitos de mamíferos mostram alguns efeitos da variação da concentração do meio extracelular sobre o volume celular. Células subitamente submetidas ao meio hiposmótico incham e, dentro de minutos, retornam parcialmente ao seu volume original. Esse comportamento foi denominado redução do volume celular regulatório (*regulatory cell volume decrease* - RVD). Inversamente, a exposição súbita ao meio hiperosmótico leva a uma redução do volume celular e, após poucos minutos, ocorre aumento regulatório do volume (*volume regulatory increase* – RVI), retornando o volume aos níveis iniciais (Fig. 1). Os mecanismos responsáveis pelo RVD ou RVI podem diferir entre diferentes tipos celulares, mas

em geral envolvem a ativação de sistemas de transporte de íons e solutos orgânicos na membrana plasmática (Häussinger e cols., 1994).

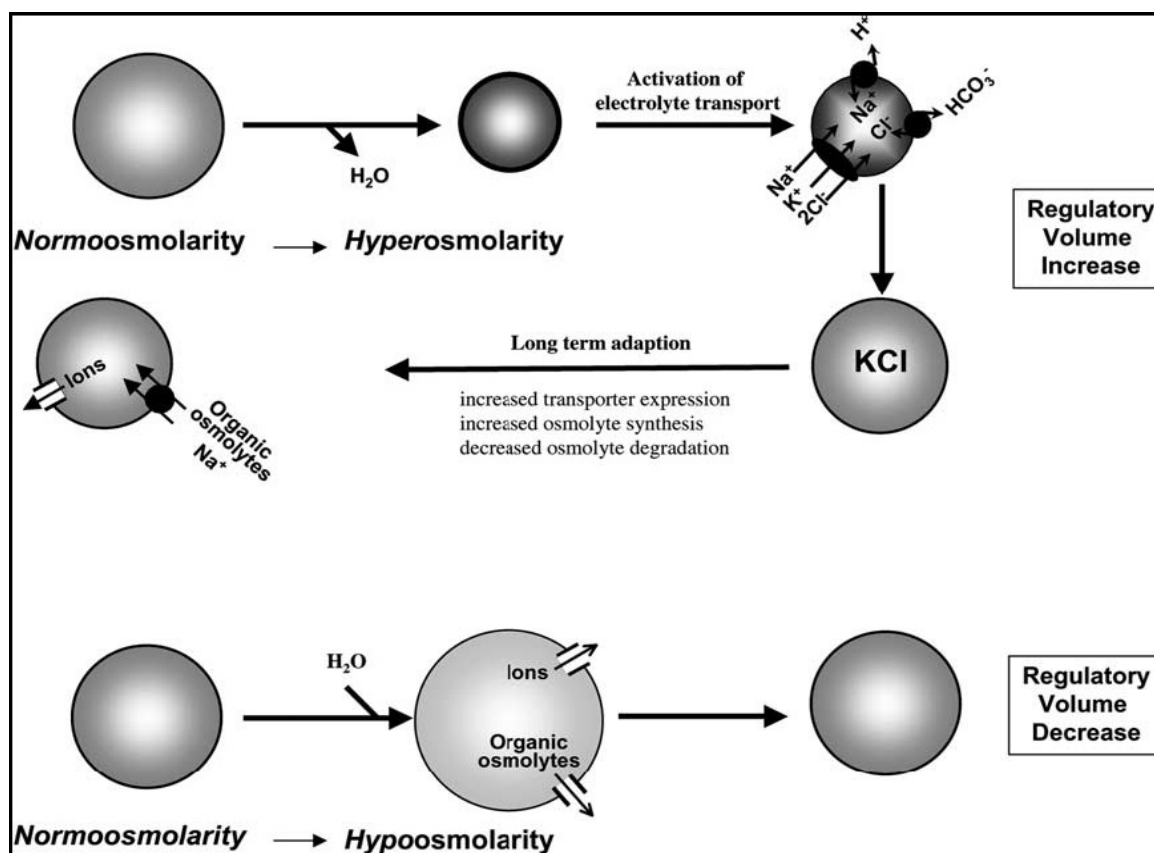


Figura 1: Estratégias de regulação do volume celular (Häussinger e cols., 2004)

O íon K^+ é o principal efetor inorgânico durante os choques hipo-hiperosmóticos, pois proporciona uma limitação imediata na alteração excessiva do volume celular durante alterações osmóticas do meio extracelular. E os efetores orgânicos, como: os aminoácidos, a betaína e o glicerol são considerados os principais responsáveis pelo reajuste do volume celular durante alterações osmóticas do meio extracelular (Gilles e Delpire, 1997; Pasantes-Morales, 2006).

Mudanças de volume celular modificam várias funções metabólicas. O aumento de volume celular favorece a síntese e inibe a degradação de proteínas, de glicogênio e, em menor extensão, de lipídios. A diminuição de volume celular tem efeito oposto. O aumento de volume celular, causado pelo estresse hiposmótico, pode ser considerado como um sinal anabólico, enquanto que a redução favorece o catabolismo (Lang e cols., 1998; Häussinger e cols., 2004)

Alterações no volume celular podem ser mediadas pela presença hormonal, bem como pela ingesta de aminoácidos, substâncias osmoticamente ativas, durante o ciclo de alimentação - jejum (Fig. 2).

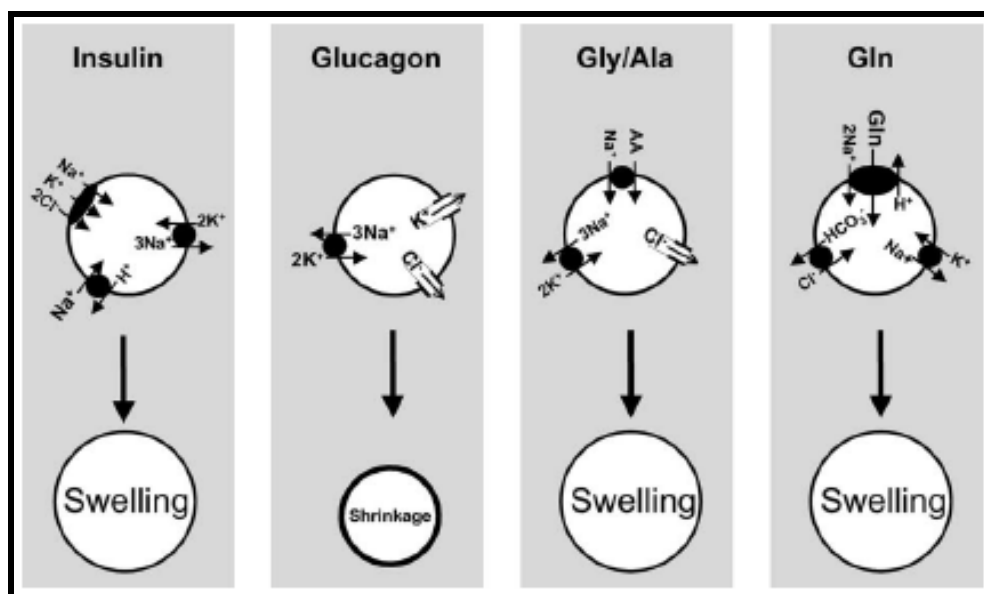


Figura 2: Modulação de volume celular por hormônios e aminoácidos (Häussinger e cols., 2004).

Aminoácidos são utilizados por diversas espécies animais como osmólitos para a modulação do volume celular. O influxo e efluxo de aminoácidos nas células, a proteólise, a síntese de aminoácidos ou a transformação bioquímica destes compostos em outros substratos

são estratégias metabólicas utilizadas na regulação do volume celular por muitas espécies de crustáceos (Fig. 3).

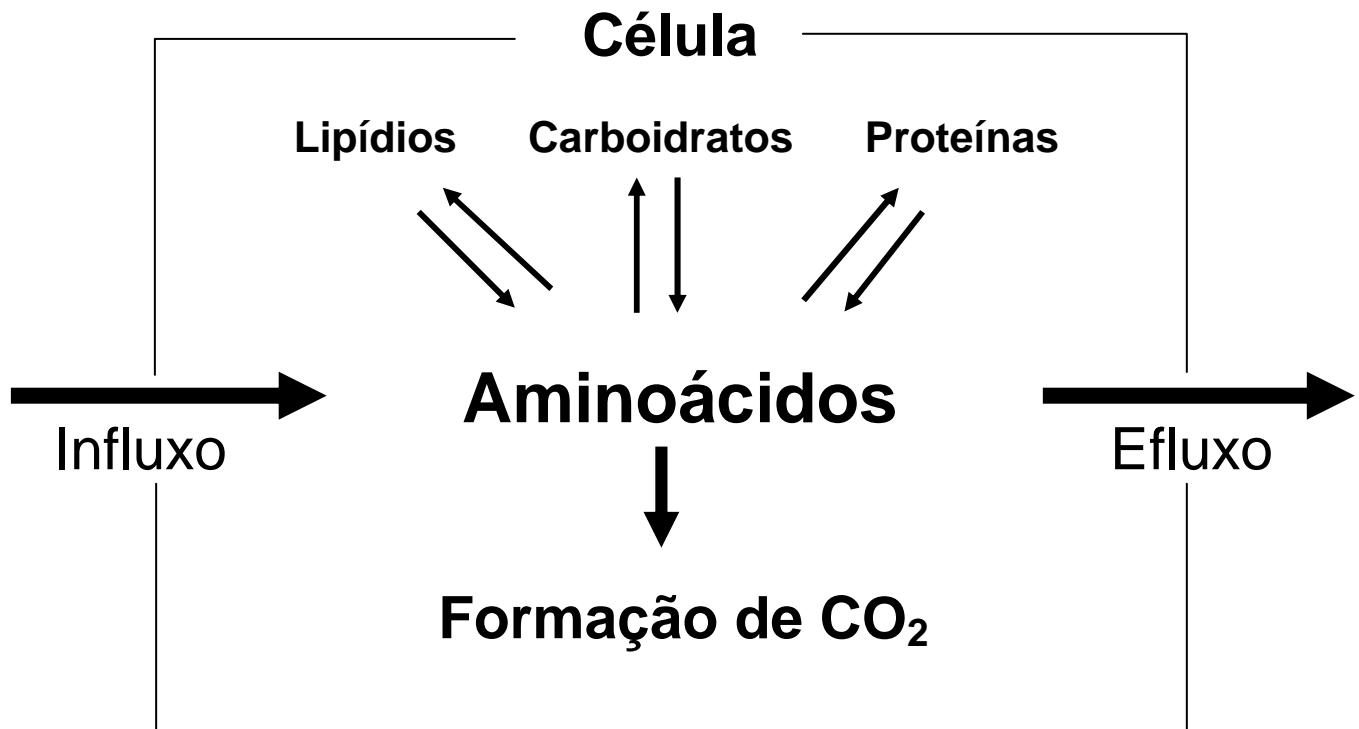


Figura 3: Alterações na concentração de aminoácidos intracelulares.

A habilidade em controlar o balanço osmótico e reparar os danos induzidos pelo estresse osmótico é essencial à vida celular (Häussinger e cols., 2004). Células expostas ao estresse hiperosmótico ativam mecanismos que detectam, reparam e protegem contra os danos oxidativos induzidos por esta condição (Lamitina e Strange, 2005).

OSMORREGULAÇÃO EM CRUSTÁCEOS

Os crustáceos apresentam basicamente dois mecanismos responsáveis pela regulação osmótica e iônica dos fluidos corporais:

1) Regulação isosmótica intracelular que envolve a manutenção do fluido intracelular isosmótico em relação ao fluido extracelular, por meio do ajuste no nível de osmólitos intracelulares, particularmente de aminoácidos livres (Péqueux, 1995; McNamara e cols., 2004; Augusto e cols., 2007).

2) Regulação anisosmótica extracelular, que ocorre de maneira associada à regulação isosmótica intracelular está relacionada à manutenção da concentração osmótica da hemolinfa relativamente constante, independente da salinidade do meio externo (Péqueux, 1995). Segundo Corotto e Holliday (1996), os mecanismos anisosmóticos extracelulares podem ser efetuados de maneira rápida, como resultado da modulação direta do comportamento cinético das enzimas como a Na^+ , K^+ -ATPase e a V-ATPase, enzimas transportadoras que participam da absorção ativa de sal através de epitélios especializados em meios hiposmóticos, ou a secreção de sal em meios hiperosmóticos (Freire e cols., 2006). Pelos íons envolvidos ou pela ação hormonal (Lucu e Towle, 2003) ou, ainda, pela translocação das moléculas dessas proteínas para a membrana plasmática (Paller, 1994).

De acordo McNamara e cols. (2004) este mecanismo reduz a variação da osmolalidade extracelular, o que confere maior proteção às células e aos tecidos contra a variação de volume celular, minimizando a dependência e a necessidade de mecanismos de regulação isosmótica intracelulares.

De acordo com Signoret e Brailovsky (2004), a salinidade é uma importante variável nos ambientes aquáticos, principalmente em zonas intertidais e estuários. Portanto, as espécies que ocorrem nestes ambientes possuem mecanismos de osmorregulação com estratégias fisiológicas, bioquímicas, morfológicas e comportamentais que permitem a sobrevivência nestes habitats com variações marcantes e rápidas de salinidade da água.

Segundo Kumlu e cols. (1999), a salinidade é um dos fatores abióticos que mais afetam o crescimento e a sobrevivência dos organismos aquáticos.

Péqueux (1995) diz que as espécies de animais existentes nesses ambientes necessitam manter estáveis a composição e o volume dos fluidos extra- e intracelulares para manter a homeostase. Além disso, Cieluch e cols. (2004) afirmam que a capacidade de regular o equilíbrio osmótico e iônico dos fluidos biológicos influencia diretamente na reprodução, na dispersão e no recrutamento destes organismos.

Atualmente são conhecidas cerca de 67.000 espécies de crustáceos (Martin e Davis, 2001), sendo a maioria destas essencialmente marinhas (Barnes e cols., 1995).

Segundo Barnes (1990), os crustáceos ancestrais surgiram no mar a aproximadamente 600 milhões de anos, contudo, a passagem para ambientes com salinidades menores que a da água do mar (de estuário a água doce) pelos decápodes iniciou-se no Terciário (cerca de 3,4 milhões de anos) (Schubart e Diesel, 1998).

A conquista do ambiente estuarino e de água doce representou uma grande evolução para esse grupo, visto que poucas espécies são capazes de suportar transições osmóticas e iônicas que ocorrem do mar para a água doce e o estuário (Augusto 2005).

Segundo Souza (2007), a capacidade de tolerância à variação de salinidade de um organismo é dependente da capacidade de regulação osmótica e iônica, ou seja, quanto maior a habilidade de manutenção de gradientes osmóticos e iônicos em condições favoráveis à homeostase, maior será a capacidade do organismo para invadir ambientes que sofrem constantes alterações de salinidade, como os estuários (Genovese e cols., 2005). Segundo Jobling (1995), a capacidade de tolerância e de adaptação à ampla variação de salinidade é denominada de eurialinidade.

De acordo com a capacidade em ocupar ambientes com diferentes salinidades, os crustáceos podem ser agrupados em duas importantes categorias (Péqueux, 1995):

- 1) os estenoalinos, que incluem representantes capazes de tolerar apenas uma estreita faixa de variação na concentração osmótica e iônica externa, ou seja, na salinidade do meio; e
- 2) os eurialinos, que são capazes de tolerar amplas faixas de variação da salinidade externa.

Segundo DeLee e Bell (1999), a distribuição das espécies nos diferentes ambientes é em parte determinada pela sua capacidade osmorregulatória, portanto, quanto mais eurialina for uma espécie, maior a sua capacidade de ocupar diferentes habitats.

Segundo Gilles e Delpire (1997), algumas adaptações permitiram aos crustáceos eurialinos ocuparem habitats estuarinos e dulciaqüícolas:

1. Redução da concentração dos líquidos corporais até valores compatíveis com a função celular;
2. Redução da ingestão de água;
3. Redução da permeabilidade do tegumento;
4. Aumento da excreção de água através da glândula antenal;
5. Presença de transporte ativo de solutos.

Essas adaptações reduzem o gasto energético para manutenção dos gradientes iônicos e osmóticos elevados.

Segundo Péqueux (1995), a relação entre a osmolalidade da hemolinfa e a do meio externo é freqüentemente expressa em termos da capacidade osmorregulatória, podendo ser:

1. Osmoconformidade: animais osmoconformadores são aqueles que estão sujeitos a ocasionais fluxos de água e sais entre o meio externo e os tecidos, e mantêm a

concentração osmótica interna próxima à do meio externo, ajustando o volume celular;

2. Osmorregulação: os osmorreguladores mantêm a osmolalidade da hemolinfa dentro de limites definidos, regulando a concentração osmótica dos fluidos extracelulares, podendo estes serem subdivididos em:

- i. Hiperreguladores: a concentração osmótica dos fluidos extracelulares é mais elevada que a do meio externo;
- ii. Hiporreguladores: a concentração osmótica dos fluidos extracelulares é mais baixa que a do meio externo.

Segundo Péqueux (1995), a capacidade osmorreguladora é uma característica marcante dos organismos existentes em zonas estuarinas.

Estudos têm reportado que as brânquias dos crustáceos desempenham diferentes funções de acordo com sua posição. As brânquias anteriores apresentam funções relacionadas à respiração e as trocas gasosas, enquanto as brânquias posteriores estão relacionadas às trocas iônicas e a osmorregulação (Copeland e Fitzjarrell, 1968, Mantel e Farmer, 1983, Luquet e cols., 2002; Genovese e cols., 2004).

As brânquias são o principal órgão responsável pelo controle da osmolalidade da hemolinfa em crustáceos de ambiente aquático. Elas também têm papel vital nas trocas gasosas (Bötcher e Siebers, 1993), regulação ácido-base da hemolinfa (Henry e Wheatly, 1992) e excreção de compostos nitrogenados (Weihrauch e cols., 2004). Luquet e cols. (2002) sugerem que a capacidade adaptativa às variações de salinidade dos ambientes onde vivem deva-se, principalmente, à atividade dos ionócitos (células do epitélio branquial especializadas em captura iônica).

Além das brânquias, os crustáceos possuem as glândulas verdes ou antenais adjacentes às antenas, cada uma consistindo de saco terminal, labirinto, canal nefridial e bexiga (Barnes, 1990). Os poros excretores abrem-se na superfície inferior das bases das segundas antenas. O filtrado inicial que entra na glândula antenal é isosmótico em relação à hemolinfa e modificações por processos de reabsorção e de secreção tubular ocorrem durante a passagem deste filtrado pela glândula antenal (Mantel e Farmer, 1983), dando origem a uma urina hiposmótica em relação à hemolinfa (Sarver e cols., 1994).

MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTRESSE OSMÓTICO

De acordo com Freire e cols. (2003), os decápodes, por exibirem notáveis adaptações para viverem em ambientes que vão do marinho até os ambientes de água doce, passando por estuários e águas costeiras, são utilizados frequentemente como modelos em estudos que visam o entendimento dos mecanismos de osmorregulação. Os mesmo autores ressaltam a existência de uma vasta gama de informações sobre a regulação e a composição dos fluidos corporais, especialmente da hemolinfa e, em menor grau, da urina e dos fluidos intracelulares, de uma ampla variedade de crustáceos expostos às diversas salinidades.

Em caranguejos terrestres, a troca iônica, a excreção de CO_2 e de amônia são comprometidas (Morris, 2001). Segundo Morris (2001), na tentativa de minimizar a perda de sais pela urina, estes caranguejos redirecionam a urina para as brânquias, onde ocorre uma reabsorção dos sais. Morris (2001), estudando o caranguejo terrestre *Gecarcoidea natalis* e o anomura terrestre *Birgus latro*, verificou que eles podem diminuir em 5% a concentração de NaCl da urina via redirecionamento para as brânquias, sendo este sistema de filtração e de reabsorção considerado análogo aos rins dos vertebrados (Fig 4).

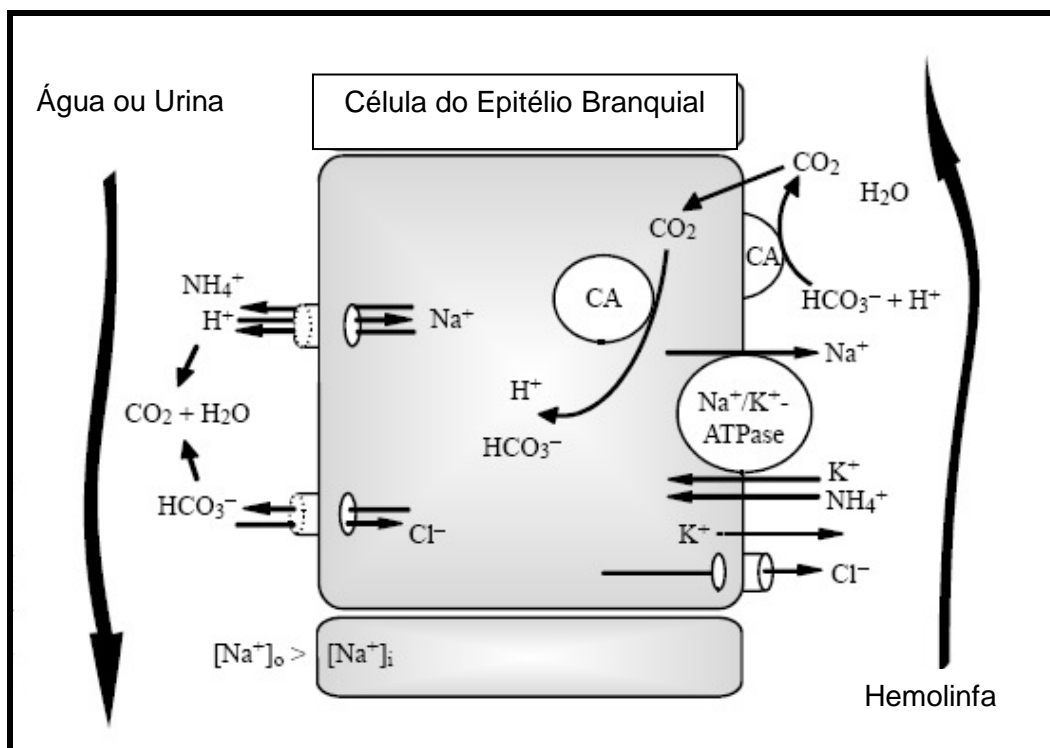


Figura 4: Modelo de epitélio branquial representando mecanismo típico de troca iônica de um caranguejo terrestre, mostrando a troca apical de HCO_3^- por Cl^- e H^+ por Na^+ e a ligação entre os sistemas de excreção de CO_2 e amônia e regulação de sais. CA, anidrase carbônica. (Morris, 2001).

Buranajitpirom e cols. (2010), estudando o camarão *Penaeus monodon*, sugeriram que o lento crescimento da espécie, quando submetida à baixa salinidade, pode ser explicado parcialmente pelos baixos níveis de íons mono e bivalentes, os quais normalmente são necessários para manter níveis metabólicos e nutricionais ótimos. No camarão *Farfantepenaeus paulensis*, os aminoácidos provenientes das proteínas dos tecidos corporais e os aminoácidos livres da ingestão de alimento são catabolizados durante a exposição à baixa salinidade, fornecendo assim a energia necessária para a manutenção da pressão osmótica e dos fluidos corporais (Lemos e cols., 2001). Além disso, Setiarto e cols. (2004), estudando o

camarão *Marsupenaeus japonicus*, constataram um aumento significativo no consumo de oxigênio quando o animal era submetido ao estresse hiposmótico, sugerindo, portanto, que as estratégias para sobreviver às modificações de salinidade requerem altos níveis energéticos.

O caranguejo *N. granulata* apresenta excelente aclimação às condições experimentais de laboratório, sendo considerado um modelo biológico adequado para a investigação do metabolismo intermediário e sua regulação frente a diferentes condições fisiológicas e ambientais.

A investigação sobre estresse osmótico em *N. granulata* tem um aspecto interessante, pois neste animal é possível realizar estresse osmótico do tecido branquial *in vivo*, pois as brânquias estão em contato direto com o meio externo. Em mamíferos, as investigações são realizadas com células em cultura e não com o organismo como um todo.

NEOHELICE GRANULATA

O estuário é uma massa de água costeira com ligação com o mar aberto que, influenciado pelos movimentos das marés e de outros fatores ambientais (precipitação pluviométrica, ventos, etc...), apresenta mistura circadiana e anual da água doce com a água do mar em proporções variadas, resultando em flutuação de salinidade. O ambiente estuarino poderia ser considerado apenas como uma área de transição entre o ambiente marinho e o de água doce, porém suas características ecológicas o tornam um ecossistema diferenciado, abrigando intensa atividade reprodutiva de inúmeras espécies de moluscos, de crustáceos e de peixes, que encontram nos estuários proteção contra predadores e alimento abundante para um crescimento rápido (Odum, 1988; Day Jr e cols., 1989; Ricklefs, 2003). Esses ambientes são áreas rasas e os nutrientes trazidos pelos rios, juntamente com os sedimentos e nutrientes do fluxo marinho, contribuem para uma elevada produtividade biológica, proporcionando, dessa

forma, condições para o desenvolvimento e a criação de diversas espécies (Odum, 1983; Ricklefs, 2003).

O caranguejo *Neohelice granulata* (Crustacea, Decapoda, Veronidae), que evoluiu a partir de formas marinhas, é uma espécie tipicamente estuarina. Habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul (RS), além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o Golfo de San Martin, na Argentina (Botto e Irigoyen, 1980).

O caranguejo *N. granulata* pode ser encontrado entre os pisos supra e mesolitorâneos, em áreas inundáveis com ou sem vegetação halo-hidrófila. Nesses locais, eles abrem galerias ou tocas com profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático, fazendo com que haja sempre água no fundo da toca. Essas habitações têm papel importante na ecofisiologia deste crustáceo, uma vez que minimizam as amplitudes das variações de salinidade e de temperatura (Turcato, 1990).

De acordo com Bass e cols. (2005), a densidade populacional, a razão sexual e a distribuição de frequência de tamanho variam com as estações do ano e entre os microhábitats, sugerindo que a estrutura das populações de *N. granulata* é dinâmica, com uma clara segregação espacial de tamanho e de sexo. As diferenças de densidade, de tamanho e de período reprodutivo entre as populações não são somente associadas à latitude, mas também aos fatores como disponibilidade de alimento e de estresse térmico (Bianchini e cols., 2008).

Segundo Bond-Buckup e cols. (1991), os caranguejos maiores, principalmente os machos, são facilmente encontrados em locais abertos, enquanto que os jovens e as fêmeas refugiam-se junto à vegetação, principalmente nos juncos.

Em relação ao comportamento alimentar, o *Neohelice granulata* é uma espécie omnívora detritívora e alimenta-se em seu hábitat predominantemente de vegetais e de detritos (Bond-Buckup e cols., 1991). O hábito alimentar oportunista foi caracterizado por meio de análise do conteúdo estomacal, que revelou a presença de sedimentos e de restos de origem vegetal e animal que apresentavam diferenças quantitativas e qualitativas conforme a estação do ano (D’Incao e cols, 1990). Esse caranguejo, oportunamente, se alimenta de outros animais e eventualmente comporta-se como canibalista, atacando sua própria comunidade (Botto e Irigoyen, 1980).

O *N. granulata*, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos e cols., 1987), é capaz de suportar longos períodos fora da água e de exposição ao sol, sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon e cols., 1974). Quando expostos ao ar atmosférico, diminui o consumo de oxigênio e reduz a mobilidade (Santos e cols., 1987). Algumas espécies de caranguejos, como o *N. granulata*, possuem a habilidade de manter as brânquias constantemente umedecidas ao saírem do ambiente aquático. Esta estratégia é possível por meio de um sistema de circulação localizado entre as bases dos pereiópodos que captam a água da superfície externa do corpo e a liberam na cavidade branquial, promovendo a renovação dos teores de oxigênio (Hartnoll, 1998; Bond-Buckup e cols., 1991; Luquet e cols., 2000).

Na Lagoa de Tramandaí no Estado do Rio Grande do Sul (hábitat natural desse animal), a salinidade pode variar de 0,22‰ a 35‰ e a concentração de O₂ dissolvida na água varia de 2,80 mg O₂/L a 11,78 mg O₂/L, podendo chegar a valores próximos de zero durante o inverno (Turcato, 1990).

Segundo Bromberg (1992), *N. granulata* pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, uma vez que suporta amplas variações de salinidade, sendo capaz de

hiperregular de 0‰ a 20‰ e hiporregular em 40‰. O ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰ no inverno e no verão, respectivamente. A autora destacou o processo de regulação isosmótica intracelular como parte dos mecanismos envolvidos na capacidade de adaptação desse caranguejo aos meios com diferentes salinidades, visto que as concentrações hemolinfáticas de íons sofrem consideráveis alterações após os choques osmóticos.

Cervino e cols. (1996) demonstraram que caranguejos *N. granulata* aclimatados durante 45 dias às salinidades de 7, 12, 20 ou 34 ‰, quando tinham liberdade em escolher uma entre estas quatro salinidades, optavam pela salinidade mais elevada, quando tinham sido previamente aclimatados à salinidade de 20 ou 34 ‰. Entretanto, aqueles animais aclimatados as baixas salinidades não apresentaram nenhuma preferência. Novo e cols. (2005) avaliaram a capacidade de osmorregulação entre *N. granulata* machos e fêmeas; os autores constataram diferenças marcantes entre os gêneros, tanto no inverno quanto no verão; as fêmeas apresentam uma melhor capacidade de hiporregular que os machos.

Em crustáceos, a glicose é uma das principais fontes energéticas para os ajustes metabólicos durante o processo de osmorregulação (Santos e Nery, 1987; Da Silva e Kucharski, 1992; Nery e Santos, 1993; Oliveira e Da Silva 2000; Bianchini e cols., 2008).

O envolvimento do metabolismo intermediário durante o processo de aclimação ao estresse hipo e hiperosmótico em *N. granulata* foi constatado por Santos e Nery (1987). Os autores demonstraram alterações nos níveis de glicose da hemolinfa em caranguejos expostos a diferentes salinidades.

A composição da dieta administrada previamente ao *N. granulata* altera a resposta metabólica ao estresse osmótico. Da Silva e Kucharski (1992), estudando o efeito da composição da dieta sobre a resposta do metabolismo de carboidrato ao estresse hiposmótico em *N. granulata*, verificaram uma diminuição significativa dos níveis de glicogênio

no músculo em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos. Nesse mesmo estudo, os autores constataram, nos caranguejos alimentados com uma dieta rica em proteínas, um aumento significativo dos níveis de glicogênio hepatopancreático às 72 horas de estresse hiposmótico, entretanto, nenhuma variação significativa da concentração deste polissacarídeo foi constatada no músculo (Da Silva e Kucharski, 1992).

Nery e Santos (1993), avaliando o efeito do estresse osmótico sobre os níveis de carboidratos na hemolinfa, nas brânquias, no músculo e no hepatopâncreas de *N. granulata*, verificaram, no verão, um aumento dos níveis de carboidratos em quase todos tecidos de animais submetidos aos choques hiposmótico ou hiperosmótico. Contudo, no inverno, a mobilização de carboidratos ocorreu somente nas brânquias e no hepatopâncreas.

A via gliconeogênica muscular, hepatopancreática e branquial participa do ajuste metabólico da concentração de aminoácidos durante a aclimação do *N. granulata* ao estresse hipo- e hiperosmótico (Oliveira e Da Silva, 2000; Schein e cols., 2004; 2005; Chittó e cols., 2009).

A conversão de [^{14}C]-glicerol em [^{14}C]-glicose diminuiu no primeiro dia de estresse hiperosmótico em brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata*, no inverno. Já no verão, a conversão de [^{14}C]-glicerol em [^{14}C]-glicose em brânquias posteriores diminuiu no terceiro dia de estresse hiperosmótico (Chittó e cols., 2009). Recentemente, Martins e cols. (2010) demonstraram que a conversão de [^{14}C]-glicina em lipídios totais é uma estratégia metabólica utilizada durante o processo de osmorregulação em diferentes tecidos de *N. granulata*.

Luvizzotto-Santos e cols. (2003) verificaram em *N. granulata* que a concentração de lipídios totais nas brânquias e no músculo foi significativamente menor em caranguejos submetidos por sete dias ao estresse hiposmótico, quando comparada àquela dos caranguejos submetidos ao mesmo período de estresse hiperosmótico ou mantidos em

condições controle. As reservas lipídicas do hepatopâncreas não foram mobilizadas durante o estresse osmótico (Luvizzotto-Santos e cols., 2003). Em *N. granulata* submetido ao estresse hiperosmótico, a concentração de lipídios totais diminui nas brânquias posteriores, no hepatopâncreas e no músculo, sugerindo que este substrato energético seria utilizado durante o esforço de aclimatação ao meio hiperosmótico (Chittó e col., 2009).

ESPÉCIES ATIVAS DE OXIGÊNIO (EAO), SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de espécies ativas de oxigênio ocorre principalmente durante os processos de oxidação biológica, como a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa para a formação de ATP na mitocôndria. O oxigênio (O_2) é reduzido até água (H_2O), recebendo 4 elétrons de uma só vez pela citocromo oxidase. Contudo, em virtude de sua configuração eletrônica, o oxigênio tem uma forte tendência de receber um elétron de cada vez, gerando compostos intermediários muito reativos (Fig. 5 A) como: o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^\cdot). As EAOs são formadas em aproximadamente 5% de todo processo das oxidações biológicas em organismos aeróbicos (Halliwell, 2000; Hermes-Lima e cols., 2001).

A reação do peróxido de hidrogênio com íon ferroso ou cúprico é chamada reação de Fenton, levando à produção do radical hidroxil (Fig. 5 B). O radical hidroxil também pode ser formado a partir da reação do ânion superóxido com o peróxido de hidrogênio em presença de íons divalentes de metais de transição, reação de Haber-Weiss (Halliwell, 2000; Hermes-Lima e cols., 2001)(Fig. 5 C).

As EAOs são oxidantes e podem apresentar pelo menos um elétron desemparelhado, sendo denominadas de radicais livres. Os radicais livres são definidos como qualquer espécie

química capaz de existência independentemente da presença de um ou mais elétrons desemparelhados, sendo assim, altamente reativos e capazes de atacar qualquer biomolécula (Halliwell e Gutteridge, 1999). Outras moléculas que podem também causar danos às células são os denominados oxigênio “singlets” (estado excitado do oxigênio) (Halliwell, 2000).

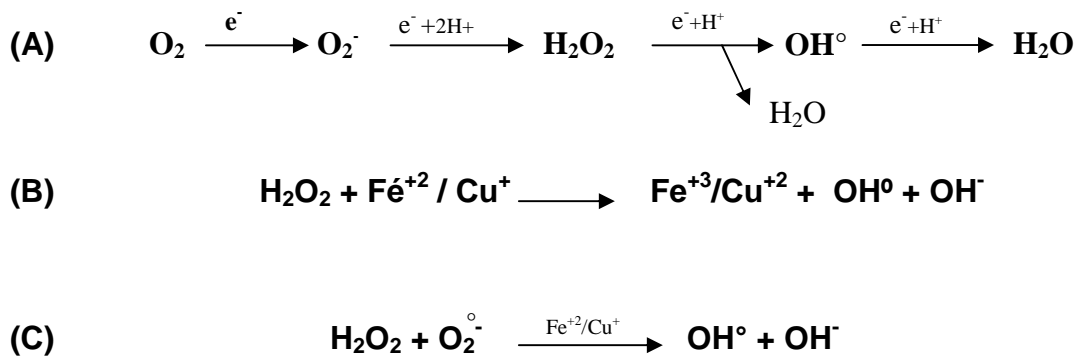


Figura 5: (A) Formação de EAO, a partir de O_2 ; (B) reação de Fenton; (C) reação de Haber-Weiss (Halliwell, 2000).

A magnitude da reatividade das EAOs está relacionada com seus elétrons desemparelhados, que lhes conferem a instabilidade característica. As reações com os radicais são muito rápidas e ocorrem em cadeia, pois os elétrons desemparelhados favorecem as colisões moleculares. Um exemplo do potencial reativo das EAOs é a lipoperoxidação nas membranas celulares (Halliwell, 2000; Hermes-Lima e cols., 2001).

Os organismos aeróbios possuem sistemas de defesa contra os efeitos causados pelas EAOs. O sistema de defesa antioxidante é composto por elementos não enzimáticos e enzimáticos. Há substâncias que neutralizam a ação dos radicais livres na lipoperoxidação, que são denominadas de sequestradoras (scavengers), como exemplo, as enzimas antioxidantes e os tocoferóis. Outras substâncias absorvem a energia de excitação dos radicais livres e são

chamadas de *quenchers*, como exemplo, o ácido ascórbico e os carotenóides (Singal e cols., 2000).

Dentre os compostos não-enzimáticos destacam-se as vitaminas E (tocoferol), C (ácido ascórbico), o precursor da vitamina A (β -caroteno) e o tripeptídeo glutatona (Cristofanon e cols., 2006).

A ação antioxidante formada pelo sistema enzimático age em sinergismo com a ação dos antioxidantes não enzimáticos (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação entre dois íons superóxido (dismutação) para formar peróxido de hidrogênio. Esta reação pode ocorrer espontaneamente em pH fisiológico contudo, na presença da SOD a velocidade da reação é 10^4 vezes maior (Halliwell e Gutteridge, 1999).

A catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx) são enzimas que catalisam a redução de peróxidos (peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos), impedindo a formação do radical hidroxil e, assim, o dano celular (Tsutsui e cols., 2001).

A glutatona redutase recicla o dissulfeto de glutatona (GSSG) em glutatona reduzida (GSH) (Tsutsui e cols., 2001).

As glutatona-S-transferases (GSTs) agem na detoxificação de agentes eletrofílicos, como os radicais livres e xenobióticos (Habig e cols, 1974)(Fig. 6).

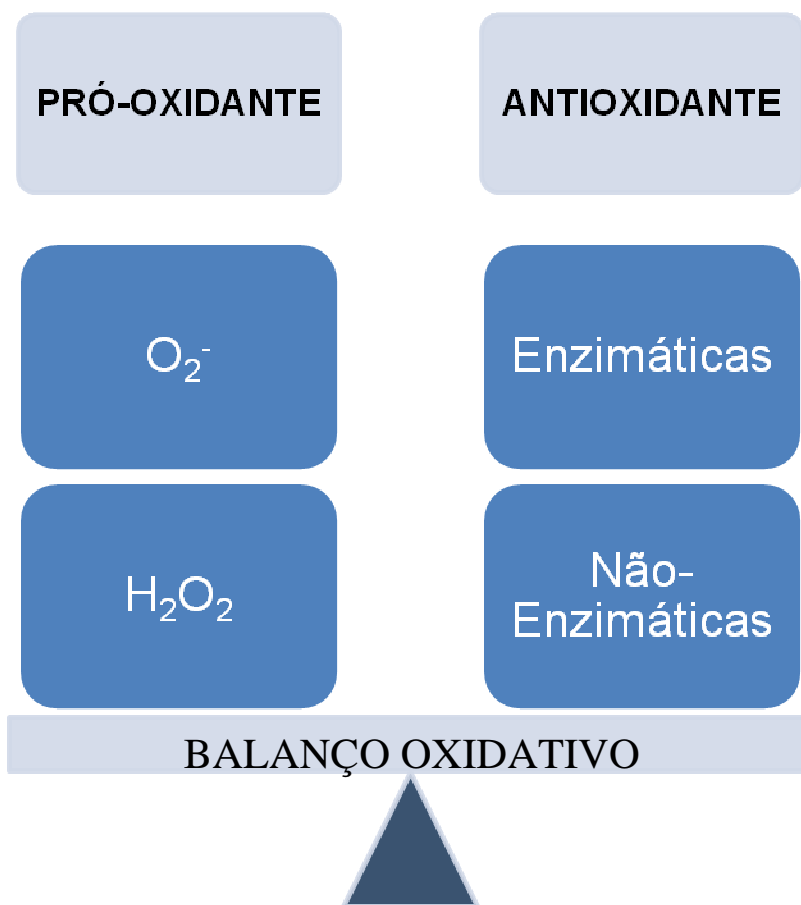


Figura 6: Balanço oxidativo: relação entre os pró-oxidantes e as defesas antioxidantes.

Sies (1985) definiu estresse oxidativo como um distúrbio do equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e os antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano celular. Assim, o estresse oxidativo pode ocorrer devido à diminuição dos sistemas de defesas antioxidantes (enzimático e não-enzimático) (Baines, 2002) ou devido à produção aumentada de EAOs, levando ao dano de biomoléculas como o DNA, os lipídios e as proteínas (Halliwell e Gutteridge, 1999; Singal e cols., 2000; Ferreira et al., 2003).

O sistema antioxidante animal pode ser modulado durante o estresse oxidativo contudo, a capacidade de modulação não é padronizada, sendo estresse tecido e espécie-específica. (Crawford e cols., 2000).

Estudos feitos em células humanas demonstraram que alterações no volume celular interferem na formação do ânion superóxido e nos níveis da enzima antioxidante glutathione redutase (Gulbins, 1997; Häussinger e cols., 2004). Segundo Livingstone (2001, 2003), alterações em fatores abióticos como temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido na água e no ar podem causar a geração de espécies reativas de oxigênio e alterações nas enzimas antioxidantes de organismos aquáticos.

Orbea e cols. (2000), utilizando técnica de imunocitoquímica, determinaram a localização de enzimas antioxidantes no caranguejo *Carcinus maenas*: a superóxido dismutase Cu-Zn localizada nos músculos a superóxido dismutase-Mn foi encontrada nos hepatócitos e a glutathione peroxidase nos hemócitos e hepatócitos.

Poucos estudos têm investigado as estratégias adotadas pelos crustáceos estuarinos para reduzir danos oxidativos ocasionados pelas variações ambientais.

No caranguejo estuarino *Neohelice granulata*, De Oliveira e cols. (2005) reportaram que a anoxia aumenta as atividades das enzimas catalase e glutathione transferase nas brânquias, enquanto, a superóxido dismutase diminui com a falta de oxigênio. Os autores também constataram que nas brânquias posteriores as atividades destas enzimas apresentavam-se mais elevadas que àquelas verificadas em brânquias anteriores (De Oliveira e cols., 2005). Segundo os autores, este mecanismo de proteção aos danos oxidativos seria uma das estratégias envolvidas na sobrevivência destes caranguejos em ambiente com frequentes variações de teor de oxigênio.

Vargas e cols. (2010), trabalhando com *Neohelice granulata* expostos a diferentes fotoperíodos - 12claro (C):12 escuro (E), luz ou escuro constantes - verificaram que as concentrações de espécies reativas de oxigênio no pedúnculo ocular são mais baixas nos animais submetidos ao escuro constante. Já a capacidade antioxidante atuando em radicais

peroxil é mais elevada no pedúnculo ocular de animais submetidos à luz ou escuro constantes. Entretanto, a catalase não apresentou variação significativa entre os grupos. Nos animais submetidos ao fotoperíodo de 12C:12E, os níveis de lipoperoxidação diminuíram no pedúnculo ocular. Segundo os autores, as radiações ultravioleta A (UV-A) e ultravioleta B (UV-B) podem produzir danos celulares significativos e alterações nos sistemas de defesas antioxidantes do sistema visual de crustáceos, entretanto, estes efeitos são dependentes do regime de fotoperíodo ao qual o animal foi submetido.

Gouveia e cols. (2005) investigaram o papel foto-protetor da dispersão dos pigmentos nos melanóforos de caranguejos *Neohelice granulata* expostos às radiações UV-A e UV-B. Os autores verificaram que epidermes com pigmentos agregados mostravam danos oxidativos e de DNA mais elevados que em epidermes com pigmentos dispersos nos melanóforos.

Maciel e cols. (2010) verificaram que a melatonina não age diretamente sobre o sistema antioxidante de defesa em brânquias de *N. granulata*, mas diminui o metabolismo aeróbico, possivelmente envolvido nas variações da defesa antioxidante dos tecidos.

Geihs e cols. (2010), verificando o efeito da melatonina no sistema antioxidante do músculo de *Neohelice granulata*, constataram que baixas dosagens são capazes de aumentar o VO_2 , as atividades da glutamato cisteína ligase e da glutathione peroxidase sem afetar os níveis de espécies reativas de oxigênio e de lipoperoxidação.

Romero e cols. (2007), estudando o caranguejo *Paralomis granulosa* exposto ao ar atmosférico por longos períodos, verificaram que o fluxo de água pelas brânquias foi interrompido, houve aumento de espécies reativas de oxigênio e, alterações no sistema antioxidante. Estas alterações foram dependentes do tempo de exposição ao ar atmosférico, com atividade máxima das enzimas após 6 horas fora da água.

Paital e Chainy (2010), estudando o caranguejo *Scylla serrata* submetido a diferentes salinidades (10, 17 e 35 ppt), verificaram que o aumento da salinidade diminui o consumo de O_2 e aumenta a excreção de amônia, os níveis de lipoperoxidação, carbonil proteína, peróxido de hidrogênio e capacidade antioxidante dos tecidos.

ENZIMA Na^+ , K^+ -ATPASE

A resposta osmorregulatória dos crustáceos é um processo finamente regulado por ação de fatores neuroendócrinos que modulam a excreção de urina, a permeabilidade corporal do animal e também o transporte de íons através do epitélio branquial (Péqueux, 1995; Spanings-Pierrot e cols., 2000; Lovett e cols., 2001; Mo e Greenaway, 2001; Tierney e cols., 2003; McNamara e cols., 1990, 1991; Freire e McNamara, 1992; Santos e McNamara, 1996; Lucu e Towle, 2003; Nan e cols., 2004; Freire e cols., 2008). Vários transportadores estão envolvidos na captura ativa de íons Na^+ em meios diluídos, contudo, a Na^+ , K^+ -ATPase parece ser o alvo primário da regulação desse processo a curto prazo, ocorrendo uma rápida diminuição da sua atividade em resposta à transferência de crustáceos osmorreguladores de baixa para alta salinidade, associada a uma diminuição proporcional do transporte ativo transepitelial de íons Na^+ (Neufeld e cols., 1980; Henry e cols., 2002; Lucu e Flik, 1999; Tresguerres e cols., 2003).

De acordo com Lehninger e cols. (1995), a Na^+ , K^+ -ATPase é uma proteína integral de membrana da classe de transportadores, todos fosforilados reversivelmente durante o ciclo de transporte, e por isso denominados P-ATPases. Esta proteína transportadora é composta por 2 subunidades (α e β) é responsável por transportar 3 íons Na^+ para fora e 2 íons K^+ para dentro das células animais por cada molécula de ATP hidrolisada (Lingrel e Kuntzweiler, 1994).

A função básica da Na^+ , K^+ -ATPase é a manutenção de elevados gradientes opostos de concentração de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática das células. Em particular, a

“bomba de sódio e potássio” é a maior contribuinte ao estabelecimento das baixas concentrações de sódio e elevadas concentrações de potássio citoplasmáticas. Além disso, apresenta grande importância na regulação do volume celular, do pH citoplasmático e da concentração de Ca^{2+} através de trocadores como o $\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NH}_4^+)$ e $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, respectivamente, e ainda contribui secundariamente para o transporte de várias moléculas nutritivas como os aminoácidos livres e a glicose (Therien e Blostein, 2000).

Por outro lado, é bem conhecido que a atividade da Na^+,K^+ -ATPase branquial aumenta significativamente em resposta à aclimatação de crustáceos hiperreguladores aos meios hiposmóticos por períodos de 1-2 semanas, enquanto diminui em resposta à aclimatação a meios de salinidade mais elevada; é observada ainda uma relação clara entre a atividade da enzima e a magnitude do transporte ativo transepitelial de íons Na^+ (Péqueux, 1995; Lucu e Towle, 2003).

A proteína Na^+,K^+ -ATPase branquial está localizadas nas invaginações basolaterais da membrana das brânquias posteriores, em contato com o espaço hemolinfático (Copeland e Fitzjarrell, 1968; McNamara e Torres, 1999; Freire e cols., 2008). Evidências indicam que a capacidade dos crustáceos em lidar com mudanças de salinidade ambiental está diretamente associada à atividade dos ionocitos (Bianchini e cols., 2008).

Em crustáceos, os mecanismos envolvidos com a modulação da atividade e da expressão da Na^+,K^+ -ATPase branquial e a translocação de moléculas da enzima entre a membrana e os reservatórios intracelulares ainda não estão bem estabelecidos (Mo e cols., 1998; 2002; Lucu e Flik, 1999; Spanings-Pierrot e cols., 2000; Mo e Greenaway, 2001; Lovett e cols., 2001; Towle e cols., 2001; Towle e Weihrauch, 2001; Henry e cols., 2002). A atividade Na^+,K^+ -ATPase é encontrada em todos os pares de brânquias (anteriores e posteriores) de *N. granulata*, contudo, são as brânquias posteriores que apresentam maior atividade enzimática

(Schleich e cols., 2001; Castilho e cols., 2001; Genovese e cols., 2004). A atividade enzimática é dependente da salinidade do meio: baixas salinidades aumentam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em brânquias posteriores (Schleich e cols., 2001; Castilho e cols., 2001; Genovese e cols., 2004). A expressão da α -subunidade da Na^+, K^+ -ATPase da brânquia posterior aumenta após aclimação ao meio hiposmótico; a aclimação ao meio hiperosmótico induz redução nos níveis de RNAm da subunidade α da enzima (Luquet e cols., 2005).

Em certas espécies de siris e de caranguejos, o aumento da atividade enzimática após aclimação dos animais aos meios hiposmótico é acompanhado por estimulação da transcrição do gene para a subunidade α da enzima (Lucu e Flik, 1999; Lovett e cols., 2002; Masui e cols., 2005). Recentemente, Faleiros (2007) constatou, em brânquias de *Macrobrachium amazonicum*, um aumento de 6,5 vezes na expressão de RNAm para a subunidade α da Na^+, K^+ -ATPase após uma hora de transferência dos animais da água doce (0,5‰) para um meio mais salino (25‰), o qual foi mantido após 5 e 24 horas de exposição à salinidade de 25‰.

As expressões de diferentes isoformas da cadeia α da Na^+, K^+ -ATPase no tecido branquial de peixes variam em resposta à salinidade do meio externo (Lee e cols., 1998; Feng e cols., 2002; Richards e cols., 2003), sugerindo que, em brânquias de crustáceos, a expressão coordenada de isoenzimas também estaria envolvida na regulação da atividade da enzima a longo prazo. Esta possibilidade, porém, tem sido pouco investigada e resultados controversos têm sido obtidos por diferentes autores.

Siebers e cols. (1983) relataram uma afinidade maior por íons Na^+ à Na^+, K^+ -ATPase branquial do caranguejo *Carcinus maenas* aclimatados a baixa salinidade (10‰), quando comparada àquela verificada em caranguejos aclimatados à água do mar, sugerindo a ocorrência de expressão de isoenzimas diferentes. Esse mesmo padrão foi verificado em *Uca*

minax (Wanson e cols., 1984). Por outro lado, não foram observadas diferenças nas afinidades pelos íons Na^+ e K^+ e pelo ATP para a Na^+, K^+ -ATPase do caranguejo *Eriocheir sinensis* aclimatado à água doce ou do mar (Péqueux e cols., 1984).

Ding e cols. (2009), estudando o camarão *Fenneropenaeus chinensis*, verificaram que este animal, em ambiente natural, sofre com a variação sazonal da salinidade. Os autores relataram que nestas condições a enzima Na^+, K^+ -ATPase ajusta ativamente a concentração iônica da hemolinfa para reduzir o estresse osmótico, e como este processo gasta muita energia na forma de ATP, esta regulação crônica pode provocar a redução da quantidade de energia disponibilizada para o crescimento do animal.

Em *Carcinus maenas* submetidos à água do mar diluída, foi constatado aumento da concentração da proteína Na^+, K^+ -ATPase, explicando, em parte, o aumento da atividade da enzima na aclimação ao meio diluído (Lucu e Flik, 1999). Resultado semelhante foi encontrado nos caranguejos *Hemigrapsus nudus* e *Leptograpsus variegatus* expostos a água do mar diluída (Corotto e Holliday, 1996; Cooper e Morris, 1997).

Já Chung e Lin (2006), estudando o caranguejo marinho *Scylla paramamosain*, verificaram um padrão de resposta às diferentes salinidades (5 ‰, 25 ‰ e 45 ‰), apresentando níveis mais elevados de atividade e de expressão da subunidade α da enzima Na^+, K^+ -ATPase quando submetidos à salinidade mais baixa.

Mañanes e cols. (2002), comparando a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase entre as brânquias anteriores e posteriores do caranguejo *Cyrtograpsus angulatus* frente a diferentes salinidades do meio externo, demonstraram a existência de uma sensibilidade diferenciada para cada unidade branquial, o que sugere um papel diferencial desta enzima no processo de transporte de íons por unidade branquial.

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (Hsp) 70 E 90

A resposta ao estresse é um mecanismo molecular altamente conservado, utilizado pelos organismos para compensar as perturbações da função celular induzidas pelas variações do meio, tendo como objetivo a manutenção da integridade e da viabilidade celular (Feder e cols., 1995; Yenari e cols., 1999). Originalmente induzida pelo choque térmico, a resposta das proteínas de estresse foi denominada resposta das proteínas de choque térmico ("heat shock proteins", Hsps) (Yenari e cols., 1999).

As proteínas de choque térmico pertencem a uma classe de chaperonas moleculares, que são proteínas responsáveis pelo correto dobramento de outras proteínas sintetizadas e pela prevenção da agregação protéica. Elas são altamente conservadas, sugerindo uma grande importância evolutiva. Entre elas estão os sistemas DnaK e GroE em procariotos, e os sistemas Hsp 90 e Hsp 70 em eucariotos. Vários estudos dão suporte à hipótese de que o choque térmico e/ou estresse oxidativo induzem uma resposta, tanto em procariotos quanto em eucariotos, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio possui papel chave na indução da produção das chaperonas (Yenari e cols., 1999).

A maioria das proteínas de estresse pertence às famílias de proteínas grandes de até 100 kDa (Hsp100, Hsp90, Hsp70 e Hsp60), as quais são altamente conservadas entre as espécies (Becker e Craig, 1994; Lindquist e Craig, 1988; Feder, 1995 ; Yenari, e cols., 1999). A Hsp70 humana, por exemplo, apresenta 73% de homologia com a Hsp70 da *Drosophila* e 50% com a da *E. coli* (Feder e cols., 1995). As Hsps estão ainda envolvidas em muitos processos essenciais para a função celular em condições fisiológicas, tais como, apresentação de antígeno, ligação ao receptor de esteróides, tráfego intracelular, ligação ao receptor nuclear e apoptose (Grigore e Indrei, 2001; Yenari e cols., 1999). Contudo, é na biossíntese de proteínas que desempenham sua função mais importante, agindo como chaperonas moleculares

(chaperoninas), auxiliando polipeptídeos nascentes a assumirem sua conformação tridimensional correta (Becker e Craig, 1994; Craig, 1985; Feder e cols., 1995; Feder e Hofmann, 1999; Zhang e cols., 2002). Da mesma forma, as Hsps protegem as células da desnaturação e da agregação de polipeptídios induzidos durante o estresse, aumentando as chances de sobrevivência da célula (Becker e Craig, 1994; Lindquist e Craig, 1988; Feder e cols., 1995; Yenari e cols., 1999).

As Hsps de 70kDa (Hsp70 ou Hsp72) são uma abundante classe de chaperonas moleculares (Lopez-Buesa e cols.,1998) com papel protetor diante da apoptose induzida por estresse (Mosser, e cols., 1997; Buzzard e cols., 1998). Outros estudos mostraram uma relação direta entre a resistência à injúria, observada em certas populações de neurônios, e a expressão de Hsp70 nestas células (Sharp, 1995; Sharp e cols., 1999).

O potencial mecanismo de proteção da Hsp70 também parece ter papel importante contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Em cultura de células gliais de camundongos, a habilidade de Hsp 70 em proteger contra a exposição ao peróxido de hidrogênio foi associada ao aumento dos níveis de glutathione, sugerindo que Hsp70 poderia proteger as células por meio de um mecanismo antioxidante (Yenari e cols., 1999). Observações feitas em ratos após isquemia cerebral sugerem que a expressão prolongada de Hsp70 potencializa o efeito protetor da SOD. A Hsp70 parece ter ainda efeito inibidor sobre a enzima óxido nítrico sintetase, atenuando o estresse oxidativo produzido durante a inflamação e a isquemia (Yenari e cols, 1999) (Fig. 7).

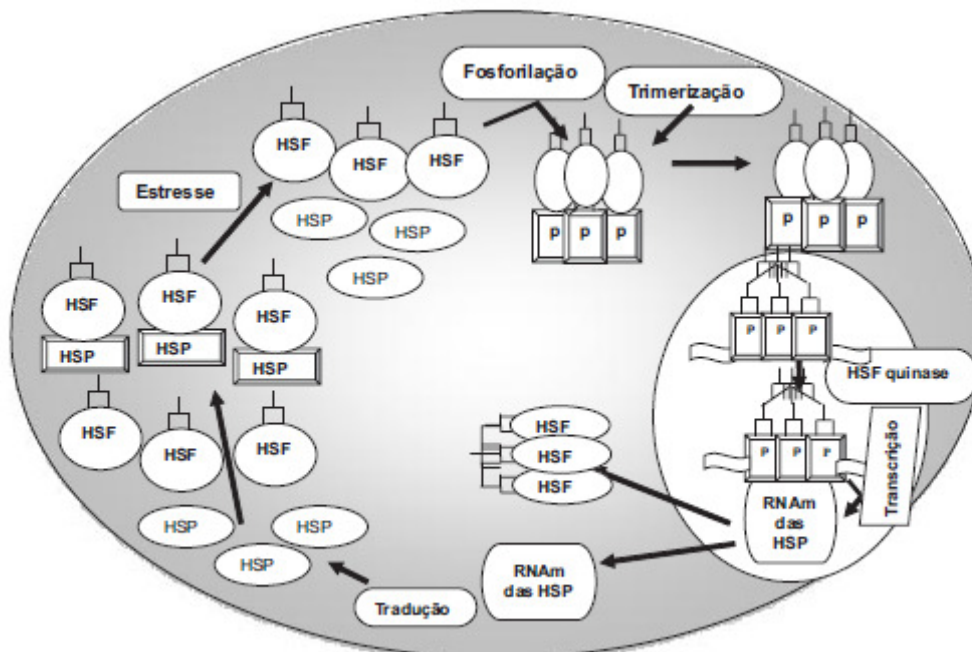


Figura 7: Mecanismo de indução da expressão das HSPs por estresse, onde em células não estressadas, sob condições normais, os níveis dos fatores de choque térmico (Heat Shock Factor - HSF) ou fatores de transcrição estão altamente presentes no citoplasma em um complexo com a própria HSP 70. Os HSF são proteínas capazes de se ligarem ao DNA regulando a expressão das HSP 70. Esse complexo HSF-HSP 70 faz com que o HSF se mantenha em uma forma monomérica não ativa (Lunz e Natali, 2005).

O estudo do papel das Hsps na fisiologia do estresse tem mostrado que todas as espécies têm genes que codificam Hsps, contudo, o padrão de expressão desses genes varia com o nível de estresse ambiental (ambiente-dependente), sendo que a expressão das Hsps, principalmente Hsp 70, tem sido utilizada como um marcador de estresse (Yenari e cols., 1999). Provavelmente, espécies que apresentam maiores níveis de expressão das proteínas de estresse estão submetidas, naturalmente, a condições ambientais mais variáveis, o que pode torná-las mais resistentes ao estresse (Feder e Hofmann, 1999). Dessa maneira, animais estuarinos, ou que permanecem parte do ciclo de vida no estuário, poderiam ser mais resistentes devido aos maiores níveis de expressão das proteínas de estresse.

Em brânquias do peixe eurialino *Plecoglossus altivelis*, transferido da água doce para a água salobra, os níveis de RNAm para Hsp 70 diminuíram significativamente após a transferência (Lu e cols., 2010).

Em moluscos, a habilidade de aumentar os níveis celulares de Hsp70 em resposta ao choque térmico foi reduzida em animais coletados em regiões de baixa salinidade (Werner, 2004). Assim, para a utilização de Hsp70 como indicador de estresse é necessário expandir o conhecimento sobre a influência de fatores abióticos, como temperatura e salinidade, sobre a expressão desta proteína.

Em *Homarus americanus* submetido ao estresse osmótico ocorreu um aumento significativo nos níveis de mRNA das Hsps 70 e 90 no hepatopâncreas e no músculo (Chang, 2005). O autor encontrou uma resposta diferenciada entre músculo e hepatopâncreas, indicando que os tecidos não respondem em conjunto ao estresse, sendo alguns deles mais ou menos sensíveis ao estresse osmótico. Neste mesmo crustáceo foi constatado um aumento na expressão do gene da poliubiquitina no hepatopâncreas, indicando aumento na degradação de proteínas ou dano “irreversível” (Spees e cols., 2002).

Recentemente, Colson-Proch e cols. (2010) demonstraram, nos crustáceos subterrâneos do gênero *Niphargus*, aumento significativo da expressão da Hsp 70 após elevação de 6°C no meio ambiente por 12h, 1, 2 e 3 meses.

O hábitat do *N. granulata* apresenta variações sazonais marcantes de osmolalidade, pH e temperatura da água que induzem alterações hemolinfática de osmolalidade de 833 mOsm/Kg no verão a 967 mosm/kg no inverno, e de pH 7,1 no outono a 7,7 na primavera (Valle e cols., 2009).

HIPÓTESE

As defesas antioxidantes e o recrutamento das proteínas de choque térmico 70 e 90 seriam estratégias utilizadas em resposta ao aumento ou redução da salinidade do meio ambiente e que permitiriam a adaptação do caranguejo *N. granulata* ao hábitat estuarino?

OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de diferentes tempos de estresse hiposmótico e hiperosmótico, *in vivo*, sobre o balanço oxidativo, a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase e na expressão das proteínas de choque térmico (Hsps) 70 e 90 em diferentes tecidos do caranguejo *Neohelice granulata*.

ESPECÍFICOS

1. Determinar a quantidade de peróxido de hidrogênio formado nas brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas e no músculo mandibular de espécimes de *Neohelice granulata* dos grupos controle e submetidos por 1 e 6 horas ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico.
2. Determinar a relação glutaciona oxidada/glutaciona reduzida nas brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas e no músculo mandibular de espécimes de *Neohelice granulata* dos grupos controle e submetidos por 1 e 6 horas ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico.
3. Determinar a atividade da enzima catalase nas brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas e no músculo mandibular de espécimes de *Neohelice granulata* dos grupos controle e submetidos por 1 e 6 horas de estresse hiposmótico ou hiperosmótico.
4. Determinar a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase nas brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas e no músculo mandibular de espécimes de *Neohelice granulata* dos grupos controle e submetidos por 1 e 6 horas de estresse hiposmótico ou hiperosmótico.

5. Determinar a expressão das proteínas de choque térmico (Hsp) 70 e 90 nas brânquias anteriores e posteriores, no hepatopâncreas e no músculo mandibular de espécimes de *Neohelice granulata* dos grupos controle e submetidos por 1 e 6 horas ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico.

METODOLOGIA

METODOLOGIA

COLETA DE ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados cem caranguejos *Neohelice granulata*, machos, pesando entre 15 e 17g, no estágio C do ciclo de intermuda (Drach e Tchernigovzeff, 1967). Os animais foram coletados com permissão do IBAMA da população natural da margem leste da Lagoa de Tramandaí (Fig. 8)(29°58' latitude Sul e 58°08' longitude Oeste), no município de Imbé, Rio Grande do Sul, Brasil. O período de coleta foi de três anos (2007-2010), sendo os animais coletados manualmente no sedimento aerno-lodoso, dentro da água ou nas tocas e transportados até o laboratório em caixas com água do próprio local (Fig. 9). Todas as coletas e os experimentos foram realizados entre os meses de outubro e abril, sempre no mesmo horário (14 horas) com o objetivo de minimizar os efeitos dos meses de inverno e das variações circadianas sobre metabolismo nestes caranguejos.



Figura 8: Estuário de Tramandaí- RS, local de coleta do *N. granulata* (acima à direita)

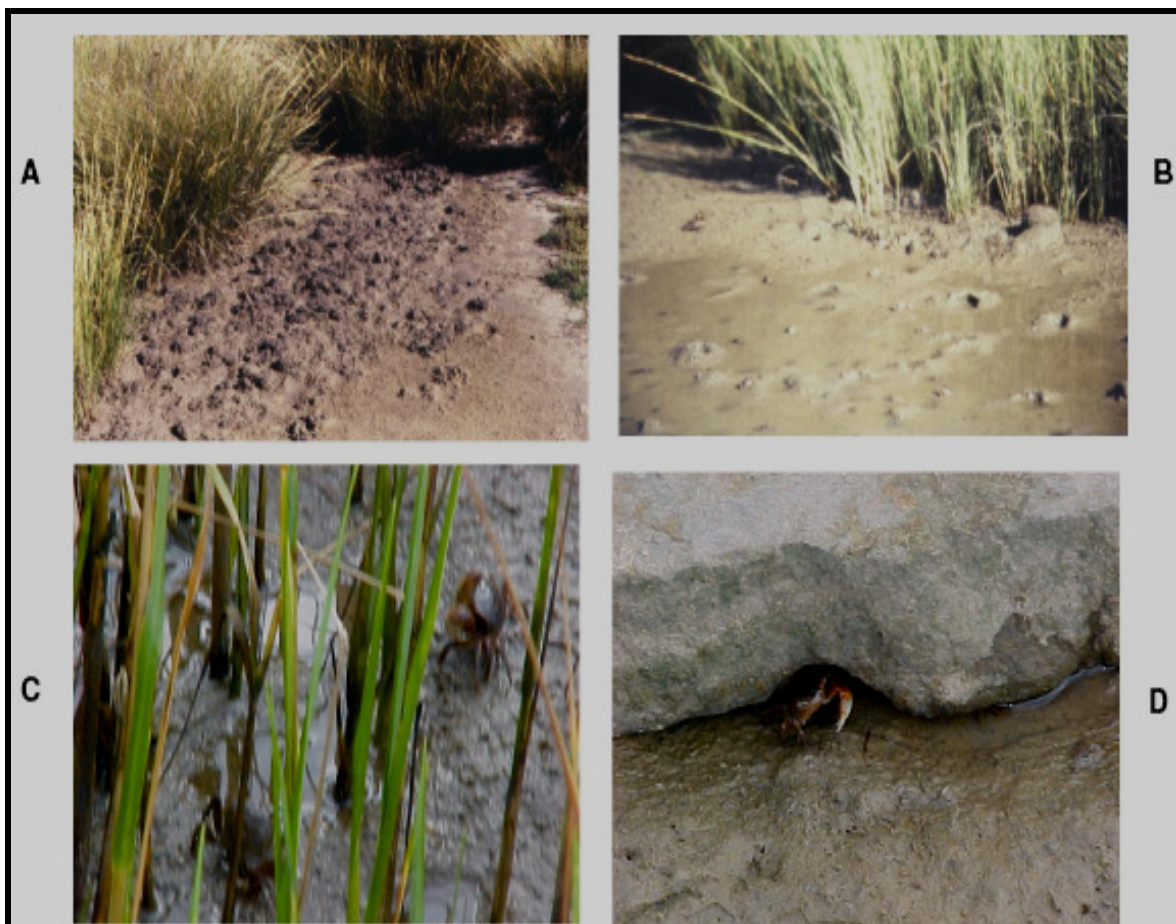


Figura 9: Hábitat de *Neohelice granulata*. A – toca em poças de maré, B – tocas junto à vegetação, C – hábitat de *Spartina sp.*, D – toca sob pedra. (Manzoni e D'incao, 2007).

ACLIMATAÇÃO DOS ANIMAIS AO LABORATÓRIO

No laboratório os animais foram submetidos a um choque hiposmótico com água destilada durante 24 horas com a finalidade de limpar o conteúdo estomacal e eliminar os parasitas (Kucharski, 1997).

Após este período, os animais permaneceram por 15 dias em aquários aerados (18,95% de O₂ dissolvido na água), salinidade de 20‰, temperatura de 25±1°C e fotoperíodo natural (12 horas claro: 12 horas escuro). Todos os dias, no final da tarde (período de maior atividade

em seu ambiente natural segundo Turcato, 1990), os animais foram alimentados com carne de boi, *ad libitum*.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

ESCOLHA DOS TEMPOS EXPERIMENTAIS

Para a escolha dos tempos experimentais, os animais foram submetidos ao estresse hiposmótico (0‰) ou hiperosmótico (34‰) nos seguintes tempos: 15, 30, 45, 60, e 360 min. Após estes períodos, os espécimes foram sacrificados por imersão em gelo e seus tecidos retirados, pesados, acondicionados e identificados sobre papéis de alumínio e colocados em estufa a 60°C, por 24 horas. Passado este tempo, os tecidos foram pesados novamente e seu peso final diminuído do peso inicial para obtenção da quantidade de água do tecido.

A Fig. 10 A, o aumento na porcentagem de água nos tecidos (~10%) ocorreu após 45 e 60 minutos de estresse hiposmótico. As brânquias anteriores e posteriores, e o músculo apresentaram aumento mais marcante de água após o estresse hiposmótico por 45-60 minutos. No hepatopâncreas não foram verificadas alterações significativas do conteúdo de água nos tempos de estresse hiposmótico estudados. Após 6h de estresse, os valores de água nos tecidos foram semelhantes àqueles do grupo controle.

Após 60 minutos de estresse hiperosmótico ocorreu redução em cerca de 5% no conteúdo de água nas brânquias anteriores e posteriores (Fig. 10 B). O músculo e o hepatopâncreas não apresentaram alterações significativas aos 60 minutos de estresse hiperosmótico. No estresse hiperosmótico por 6h, os valores de água nos tecidos foram similares àqueles verificados no grupo controle.

Desta forma, foram os tempos de 1 e 6 h de estresse osmótico os escolhidos para este estudo.

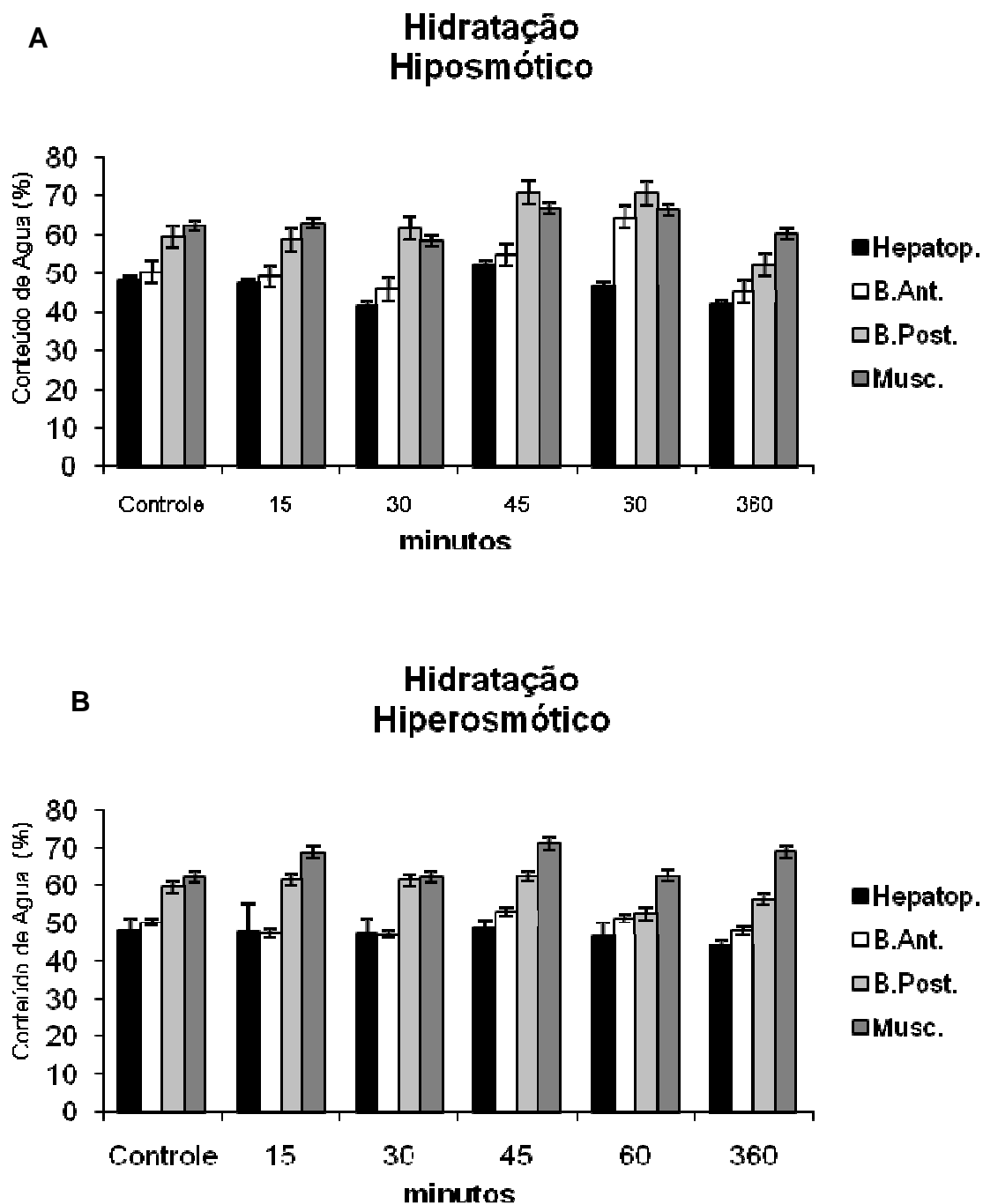


Figura 10: Conteúdo de água (%) nos tecidos (hepatopâncreas, brânquias anteriores e posteriores e músculo mandibular) de *Neohelice granulata* submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 15, 30, 45, 60 e 360 minutos (n=5).

ESTRESSE HIPOSMÓTICO E ESTRESSE HIPEROSMÓTICO

Após o período de aclimação ao laboratório, os animais foram submetidos aos estresses: hiposmótico (água destilada) de 0‰ ou hiperosmótico (água destilada e sal marinho) de 34‰. O grupo controle permaneceu na salinidade de 20 ‰. Após 1 hora os animais dos grupos controle, hiposmótico e hiperosmótico apresentaram a osmolalidade hemolinfática de 631, 569 e 590 mOsm/kg, respectivamente. Após 6 horas o grupo controle não modificou a sua osmolalidade enquanto os grupos hiposmótico e hiperosmótico apresentaram a osmolalidade de 657 e 743 mOsm/kg, respectivamente.

Durante os períodos experimentais, os animais (controles e estressados) foram mantidos em aquários, no número de 5 animais por aquário, por grupo experimental, com as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo, aeração e alimentação do período de aclimação. Essas salinidades foram encontradas no local de coleta desses caranguejos por Turcato (1990). A salinidade dos aquários foi controlada semanalmente com refratômetro (ATAGO S/MILL).

Para determinação da quantidade de peróxido de hidrogênio na água dos aquários foram colocados 5 animais por aquário, por grupo experimental, na relação de 1 animal por litro de água. Os aquários foram mantidos nas mesmas condições experimentais dos outros experimentos. Os tempos de exposição do grupo controle e dos dois grupos de estresse hiposmótico ou hiperosmótico foi de 1 e 6 horas. Ao final de cada tempo experimental (1 e 6h de estresse) foram retiradas amostras da água para quantificação dos níveis de peróxido de hidrogênio.

EXTRAÇÃO E PREPARO DOS TECIDOS

Após o término dos períodos de estresse hiposmótico ou hiperosmótico, os animais foram crioanestesiados por imersão em recipiente com gelo em escama durante 10 minutos (Fig. 10 A). A seguir, a carapaça foi removida e as brânquias anteriores e posteriores, o hepatopâncreas e o músculo mandibular excisados e utilizados nos diferentes procedimentos experimentais (Fig. 10 B).

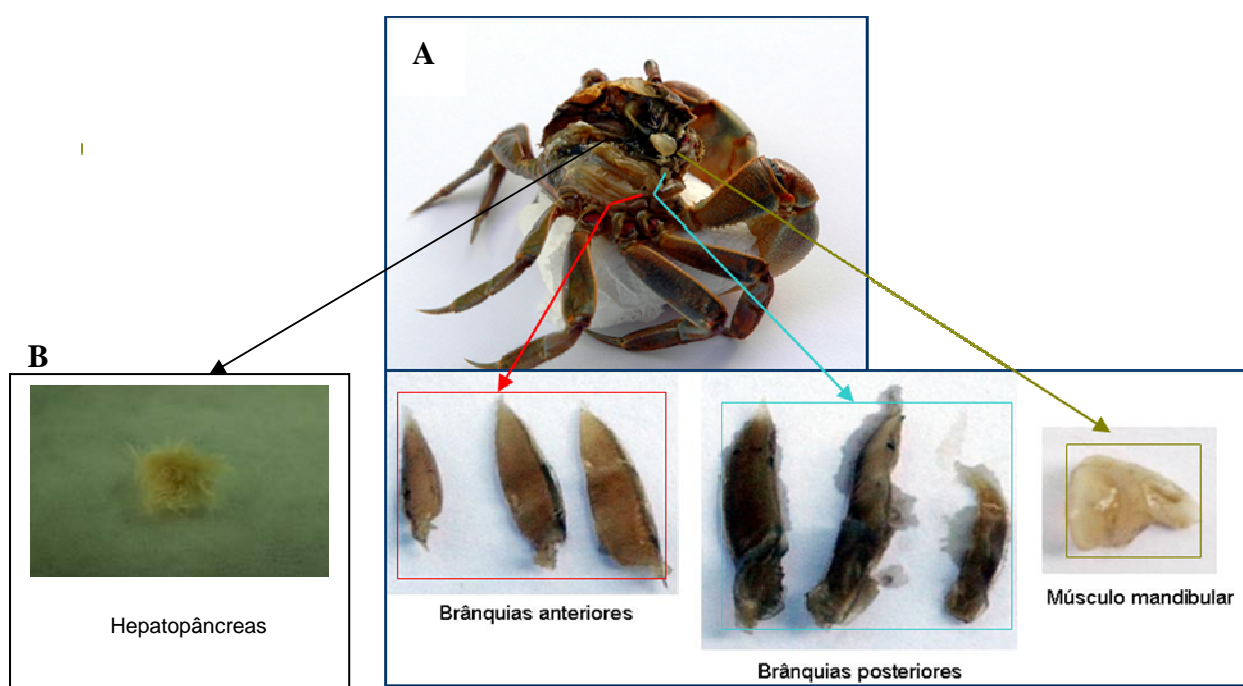


Figura 11: A - Animal anestesiado e hemi-dissecado. B - Tecidos excisados

PREPARAÇÃO DOS HOMOGENEIZADOS TECIDUAIS PARA AS TÉCNICAS DO BALANÇO OXIDATIVO

A homogeneização dos tecidos foi feita em Ultra-Turrax (T25 Basic, Ika Labor Technik) com tampão fosfato (KCl 140mM, Tampão fosfato 20mM; pH 7,4) 9 mL/g de tecido durante 40 segundos em gelo. Os homogeneizados foram centrifugados por 10 min, por 1000g, em

centrífuga Sorval, a 4 °C (5B-Rotor SM 24, Du Pont Instruments, EUA). O sobrenadante foi utilizado para os ensaios no mesmo dia do sacrifício e da homogeneização dos tecidos.

FORMAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O ensaio para a determinação da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é baseada na oxidação do vermelho fenol mediada pela peroxidase de rabanete (HRPO), resultando na formação de um composto que absorve a 610 nm, segundo método descrito por Pick e Keisari (1980). Os tecidos totais foram incubados por 60 min, a 37°C, em tampão fosfato 10mmol/L (NaCl 140 mmol/L e dextrose 5 mmol/L). Após, foi retirada um amostra do líquido de incubação e acrescentado a solução de vermelho de fenol (0,28 mmol/L) e HRPO (8,5 U/mL). Após 10 minutos foi adicionado NaOH 1 mol/L e feita a leitura a 610 nm. Os resultados foram expressos em pmoles de H_2O_2 . mg^{-1} de proteínas.

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DA GLUTATIONA OXIDADA E REDUZIDA

Para a determinação da glutathiona total, os tecidos totais foram desproteinizados com ácido perclórico 2 mol/L, centrifugados por 10 minutos a 1000 g e o sobrenadante neutralizado com KOH 2 mol/L. O ensaio foi realizado adicionando às amostras a solução de tampão fosfato 100 mmol/L (pH 7,2), nicotinamida dinucleotídeo fosfato (NADPH) 2 mmol/L, glutathiona redutase 0.2 U/mL, 5,5' ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) 70 μ mol/L. Na determinação da glutathiona reduzida, o sobrenadante neutralizado reagiu com 5,5' ditiobis (2-nitro ácido benzóico) 70 μ mol/L e a leitura foi feita a 420nm. A glutathiona oxidada foi calculada pela diferença entre a glutathiona total e a glutathiona reduzida. Os resultados foram expressos como razão entre a glutathiona oxidada pela glutathiona reduzida.

ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da catalase é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio. Sendo assim, a atividade da enzima pode ser determinada pela avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio, segundo método descrito por (Boveris e Chance, 1973). A atividade da enzima catalase foi determinada pela medida do consumo exponencial do H_2O_2 a 240 nm. Em uma cubeta de quartzo foi colocado 975 μL de tampão fosfato e 10 μL do homogeneizado previamente preparado, a cubeta foi colocada no espectrofotômetro, após adicionou-se 15 μL de peróxido de hidrogênio e a absorbância foi monitorada. Como branco foi utilizado o tampão fosfato. Os resultados foram expressos como pmoles de $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. min^{-1} .

ATIVIDADE DA ENZIMA Na^+ , K^+ -ATPASE

PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

As membranas celulares foram isoladas de acordo com o método descrito por Barnes e Blacksock (1993). O tecido foi homogeneizado (10% p/v) em tampão Tris-HCl gelado (40 mM) e fenilmetilsulfonil fluoreto (PSMF) (1mM; Sigma, St. Louis, MO, USA) pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 10,000g, a 4 C, e o sobrenadante coletado e centrifugado novamente a 40.000g (4°C). O precipitado foi resuspendido no mesmo tampão e centrifugado novamente a 40.000 g a 4° C. Este último sobrenadante foi estocado em freezer -20°C - sendo utilizado em até 12 horas após a centrifugação - para medir a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA Na^+ , K^+ -ATPASE

A atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase foi determinada no homogeneizado anteriormente preparado de acordo com Esmann (1988). O meio de incubação A continha ATP (5mM; Sigma), NaCl (60mM), KCl (10mM) e MgCl (40mM), pH 7,4. No meio de incubação B o KCl foi trocado por ouabaína (1mM; Sigma). Amostras do homogeneizado (10mg de proteína) foram incubadas a 30° C com meio A ou B, por 30 minutos. A reação enzimática foi parada pela adição de TCA 10%. O fosfato inorgânico foi determinado utilizando o método de Chan e Swaminathan (1986). A diferença de concentração de fosfato entre o meio A e B foi utilizada para determinar a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase. Todas as determinações foram realizadas em quadruplicata. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol de Pi. mg}^{-1} \text{ proteína.min}^{-1}$.

WESTERN BLOT DAS HSP 70 E 90

Para extração de proteínas, os diferentes tecidos (300 mg) foram homogeneizados com OmniMixer®, por 30s, com uma solução tampão de lise que é constituído de Tris (10mM), EDTA (100mM), PMSF (200mM), NaF (200mM), $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (10mM), Na_3VO_4 (2mM) e Triton X-100 (10%), pH 7,4. A seguir, o material foi centrifugado a 1000g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e separados cerca de 45 μL para a dosagem de proteínas totais em triplicata. Após a dosagem de proteínas, o material foi estocado a -20°C para posterior análise da expressão protéica pelo método de western blot, sendo as amostras utilizadas no prazo máximo de 30 dias.

Para a separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 10%. Aproximadamente 50 μg da proteína extraída das amostras foram incubadas com solução de Laemmli, a qual é constituída de glicerol (50%), Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) (10%), Tris

(65mM), azul de bromofenol (0,1%) e 2- β -mercaptoetanol (0,05%) a 95°C, por 3 min (Laemmli, 1970), e adicionadas em cada poço do gel. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina (192mM), Tris (25 mM) e SDS (0,1%), pH 8,3. As proteínas migraram ao longo do gel por aproximadamente 3 horas e 30 min., submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão da amostra. O equipamento utilizado foi o mini-PROTEAN[®] 3 Electrophoresis Cell (BioRad, EUA).

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no módulo de eletrotransferência em contato com a membrana de nitrocelulose (NC), coberto com tampão de transferência o qual é constituído de glicina (192 mM), Tris (25mM), SDS (0,1%) e metanol (20%), com pH 8,3. A transferência foi efetuada no sistema Trans-Blot SD – Semi Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, EUA), por 1 hora, a diferença de potencial de 25 V.

As membranas de NC contendo as proteínas foram então incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora, contendo NaCl (150mM), Tris (50mM), Tween 20 (0,05%), pH 7,4, acrescido de leite em pó desnatado (5%). Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos na membrana de NC.

Após o bloqueio, as membranas de NC foram incubadas por no mínimo 16 horas a 4°C, sob agitação constante, com os anticorpos específicos para as HSP 70 e 90 diluídos em Tween Tris Buffer Saline (TTBS) (número do catálogo H5147: *Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 antibody produced in mouse - clone BRM-22, ascites fluid (Sigma Aldrich)* e número do catálogo H1775: *Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 90 antibody produced in mouse - clone AC-16, ascites fluid (Sigma Aldrich)*). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS (1%) (3 lavagens de 10 min. cada) e então incubadas com o segundo anticorpo (número

do catálogo A9044: *Anti-Mouse IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in rabbit - IgG fraction of antiserum, buffered aqueous solution - (Sigma Aldrich)* - por 2 horas em temperatura ambiente. Após, as membranas foram lavadas com Tris Buffer Saline (TBS) (3 lavagens de 10 min. cada) e incubadas, em sala escura, com solução de Quimiluminescência por 1 minuto. A reação de quimiluminescência ocorreu por meio do sistema de detecção baseado em substratos luminescentes (luminol e ácido p-cumárico).

Após a incubação com a solução de quimiluminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico (GE Healthcare® / Amersham Hypperfilm™ ECL) por 10s, a 3 min. Realizada a revelação, o filme foi analisado por densitometria óptica e as bandas medidas por um processamento de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, EUA). A densitometria óptica das bandas da Hsp70 e Hsp90 foi corrigida pela densitometria da banda da proteína mais forte (na altura de 70KD) nas membranas de NC, a qual foi corada com Ponceau (técnica do Comassie blue). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias (UA).

QUANTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

A concentração de proteínas foi medida pelo método descrito por Lowry e cols. (1951) para a determinação do peróxido de hidrogênio e da catalase, e pelo método colorimétrico de Bradford (1976) para a determinação da enzima Na⁺, K⁺-ATPase e a técnica de Western blot para a determinação das Hsp's. Foi utilizada albumina bovina (1 mg/mL) como padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os parâmetros metabólicos passaram pelo teste de homogeneidade (teste de Levene). Para a análise estatística da curva (controle, 1 hora e 6 horas) foi aplicado o teste

ANOVA de uma via, seguido por pos-teste de Tukey para cada um dos estresses em cada tecido. Para as comparações entre estresse osmótico e diferentes tempos foi aplicado o teste ANOVA duas vias. Para as comparações das expressões entre as Hsps 70 e 90 e da formação de peróxido na água foi utilizado o teste *t* de Student. O nível de significância adotado foi de 5%. Todos os testes foram feitos com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 11.5) para Windows.

RESULTADOS

RESULTADOS

FORMAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

O estresse hiposmótico por 1 hora não alterou significativamente a formação de peróxido de hidrogênio nas brânquias anteriores. Entretanto, o estresse hiposmótico por 6 horas reduziu em cerca de 50% ($p < 0,05$) a formação de peróxido de hidrogênio, quando comparada àquela verificada no grupo controle (Fig. 12 A).

Durante o estresse hiperosmótico, a quantidade de peróxido de hidrogênio formado nas brânquias anteriores reduziu 35%, contudo, estes valores não foram significativos em relação àqueles verificados nos caranguejos controles. Após o estresse de 6 horas, a concentração de peróxido de hidrogênio diminuiu 40% ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Fig. 12 B).

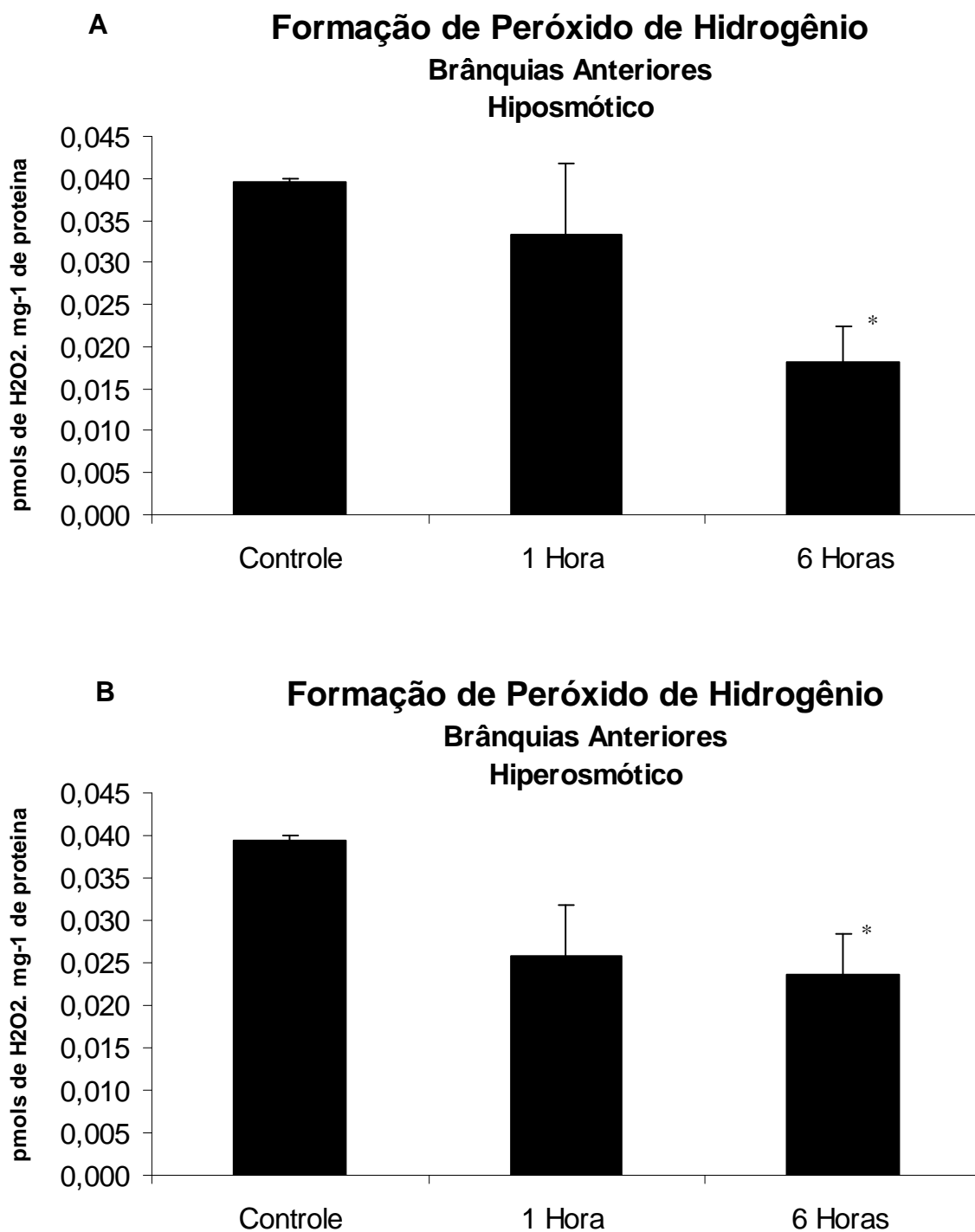


Figura 12: Formação de peróxido de hidrogênio formado nas brânquias anteriores de *Neohelice granulata* no grupo controle e nos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

Os níveis de peróxido de hidrogênio formados nas brânquias posteriores de *N. granulata* exposto ao estresse hiposmótico por 1 hora ou 6 horas foram 2 vezes ($p < 0,05$) menores que àqueles verificados no grupo controle (Fig. 13 A)

Nas brânquias posteriores de animais expostos por 1 hora ao estresse hiperosmótico foram observados níveis de peróxido de hidrogênio 3 vezes ($p < 0,05$) menores que àqueles dos animais controles. Nos animais expostos por 6 horas ao estresse hiperosmótico, os níveis de peróxido de hidrogênio foram 2 vezes ($p < 0,05$) menores que àqueles verificados no grupo controle (Fig. 13 B).

Não foram verificadas diferenças significativas de resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico entre as brânquias anteriores e posteriores. Quando comparadas às respostas aos estresses hiposmótico e hiperosmótico das brânquias anteriores ou posteriores, também não foram verificadas diferenças significativas (Fig. 13 A e B).

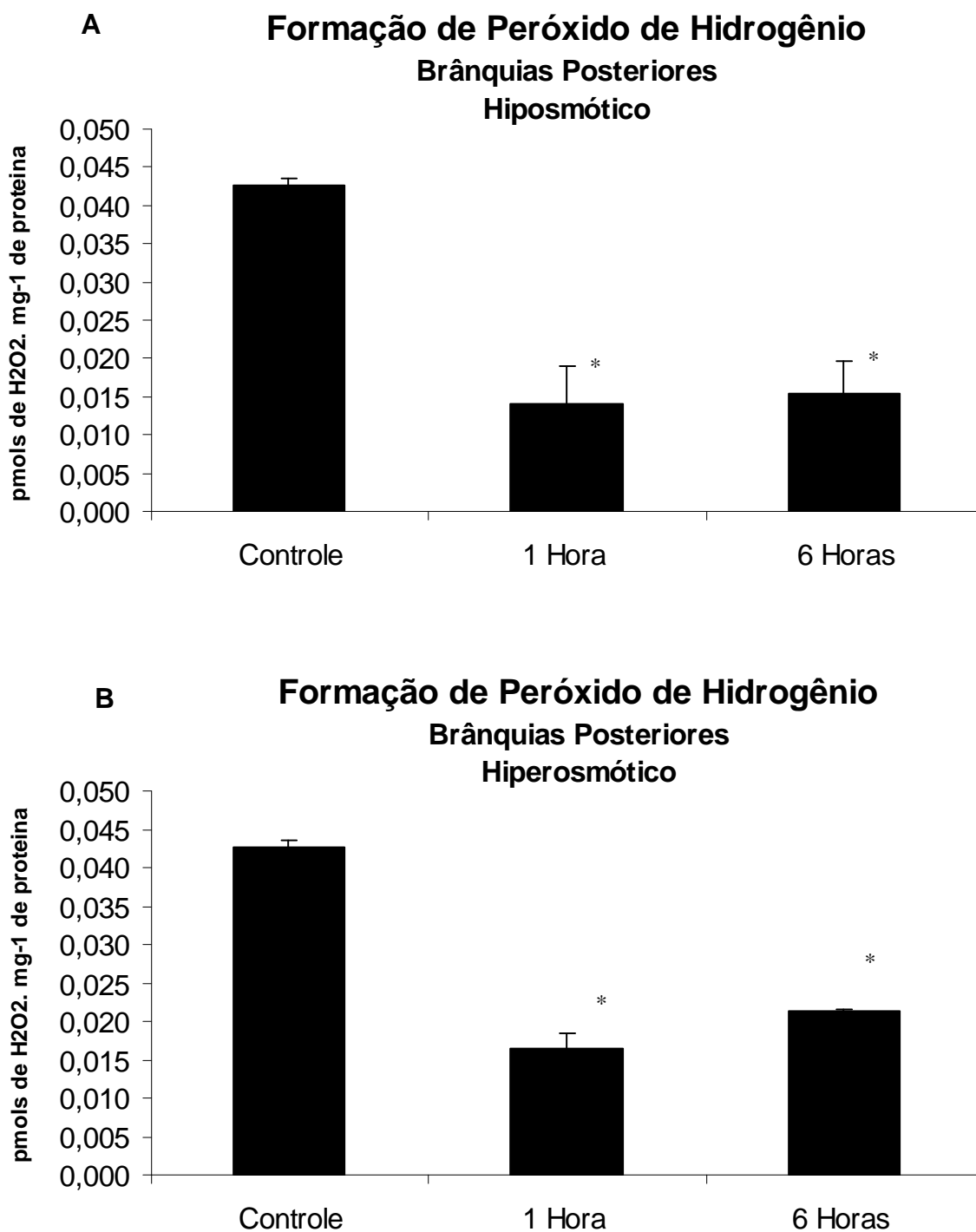


Figura 13: Formação de peróxido de hidrogênio formado nas brânquias posteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

No hepatopâncreas de caranguejos expostos ao estresse hiposmótico por 1 ou 6 horas, os níveis de peróxido de hidrogênio formados foram 50% ($p < 0,05$) menores que àqueles verificados no grupo controle (Fig. 14 A).

Em hepatopâncreas de animais expostos por 1 ou 6 horas de estresse hiperosmótico foram observados níveis de peróxido de hidrogênio 4 vezes ($p < 0,05$) menores que àqueles do grupo controle (Fig. 14 B).

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de peróxido de hidrogênio em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no hepatopâncreas (Fig. 14 A e B)

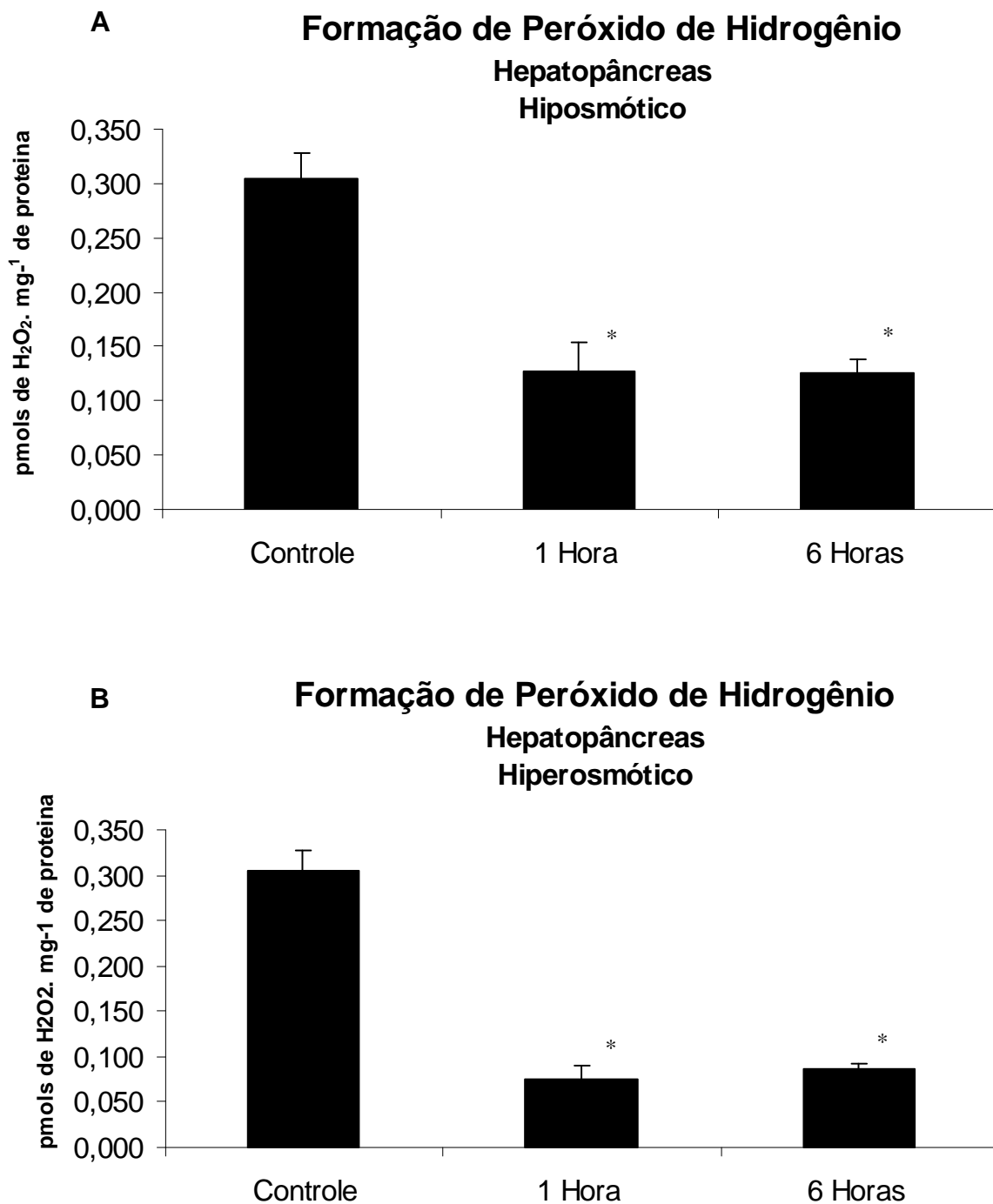


Figura 14: Níveis de peróxido de hidrogênio formado no hepatopâncreas de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

Os níveis de peróxido de hidrogênio formado no músculo de *N. granulata* exposto ao estresse hiposmótico por 1 ou 6 horas foram 10 vezes ($p < 0,05$) menores que àqueles verificadas nos caranguejos controles (Fig. 15 A). No músculo de animais expostos por 1 hora ao estresse hiperosmótico foram observados níveis de peróxido de hidrogênio semelhantes àqueles do grupo controle (Fig. 15 B). Entretanto, nos animais expostos por 6 horas ao estresse hiperosmótico, os níveis de peróxido de hidrogênio formado foram 10 vezes ($p < 0,05$) menores que àqueles verificados nos controles (Fig. 15 B).

Quando comparadas às respostas aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no músculo mandibular não foram verificadas diferenças significativas nos níveis de peróxido de hidrogênio (Fig. 15 A e B).

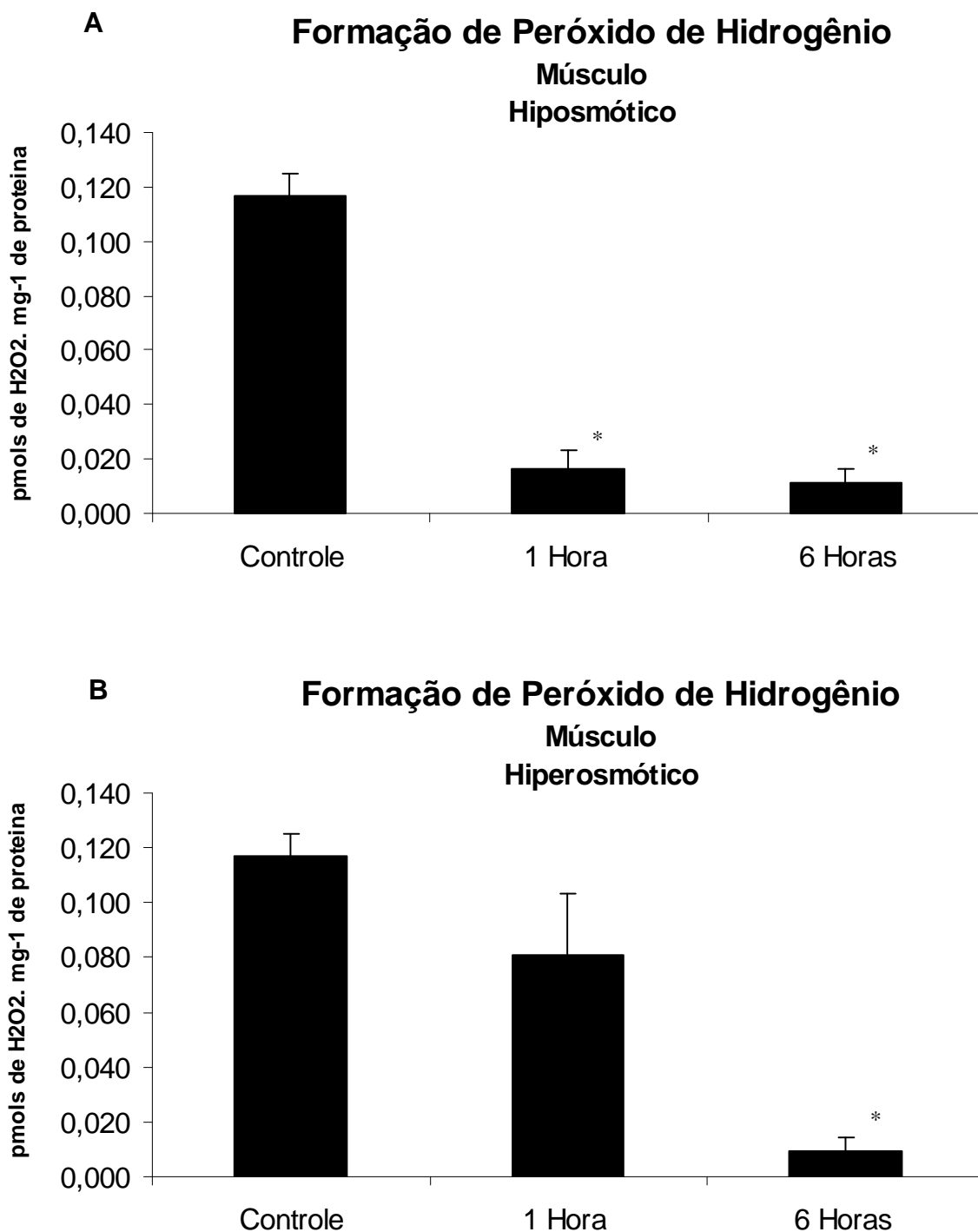


Figura 15: Níveis de peróxido de hidrogênio formado no músculo mandibular de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

Os níveis de peróxido de hidrogênio encontrados na água do aquário após 1 ou 6 horas de estresse hiposmótico foram cerca de 50% e 80% menores ($p < 0,05$), respectivamente, que àqueles verificados no grupo controle (Fig. 16).

Após 1 hora de estresse hiperosmótico os valores de peróxido de hidrogênio na água do aquário foram cerca de 80% ($p < 0,05$) menores que àqueles verificados no aquário dos caranguejos controles (Fig. 16). Entretanto, após 6 horas de estresse hiperosmótico, os níveis de peróxido de hidrogênio na água do aquário aumentaram significativamente ($p < 0,05$), quando comparados àqueles verificados nos aquários dos grupos: controle e estresse hiperosmótico de 1 hora (Fig. 16).

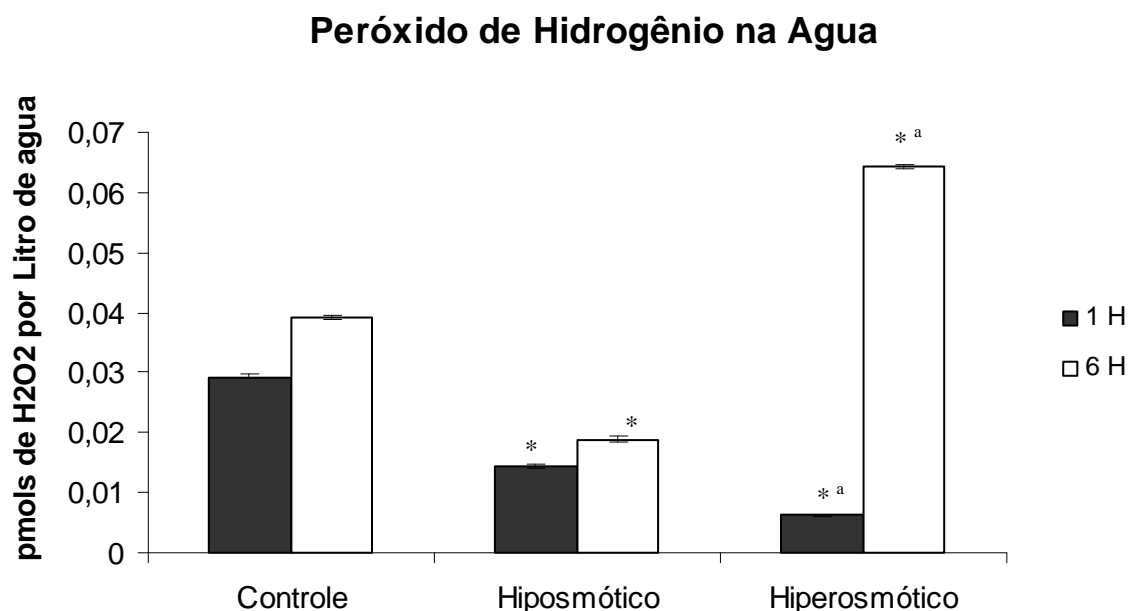


Figura 16: Níveis de peróxido na água dos aquários do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora ($n=3$). O teste utilizado foi teste t de student.

RELAÇÃO DA GLUTATIONA OXIDADA / GLUTATIONA REDUZIDA

A relação glutaciona oxidada e reduzida nas brânquias anteriores de caranguejos expostos ao estresse hiposmótico durante 1 hora foi 18 vezes ($p < 0,05$) menor que àquela verificada no grupo controle (Fig. 17 A). Entretanto, quando os caranguejos foram expostos por 6 horas ao estresse hiposmótico a relação glutaciona oxidada e reduzida, nas brânquias anteriores, aumentaram 13 ($p < 0,05$) e 188 vezes ($p < 0,05$), quando comparadas àquelas obtidas nos grupos controle e estresse de 1 hora, respectivamente (Fig. 17 A).

Nas brânquias anteriores dos animais expostos ao estresse hiperosmótico durante 1 hora, a relação glutaciona oxidada e reduzida foi 17 vezes ($p < 0,05$) inferior àquela constatada no grupo controle (Fig. 17 B). Contudo, após 6 horas de estresse hiperosmótico a relação glutaciona oxidada e reduzida, nas brânquias anteriores, retorna a valores semelhantes àqueles verificados nos caranguejos controles (Fig. 17 B).

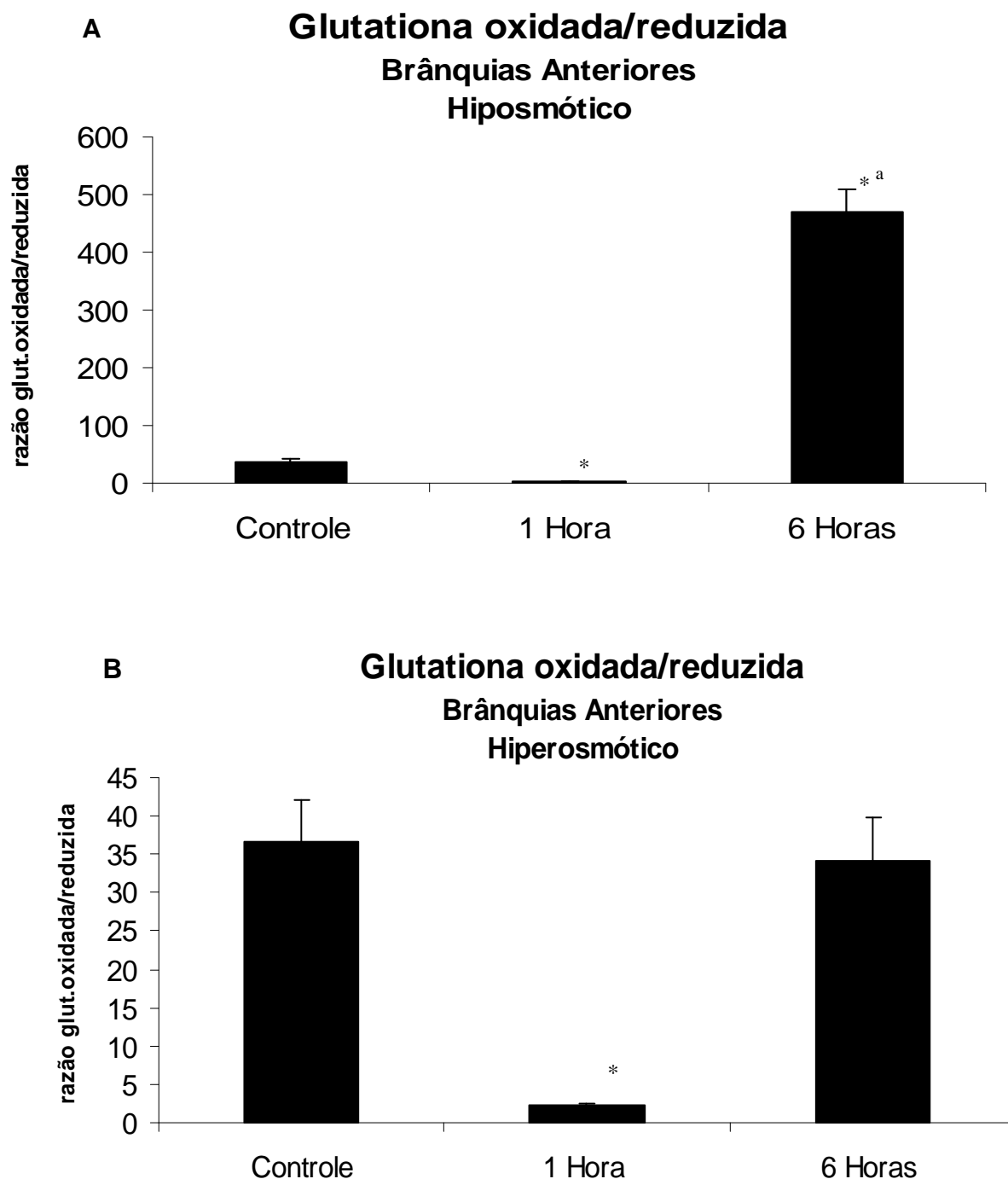


Figura 17: Relação glutaciona oxidada e reduzida nas brânquias anteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; ^a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A relação de glutathiona oxidada e reduzida nas brânquias posteriores de caranguejos expostos ao estresse hiposmótico durante 1 hora foi 10 ($p < 0,05$) vezes menor que àquela verificada no grupo controle (Fig. 18 A). Contrariamente, nos caranguejos expostos por 6 horas ao estresse hiposmótico os valores foram 3,6 ($P < 0,05$) e 34 vezes ($p < 0,05$) maiores que àqueles verificados nos grupos controle e 1 hora de estresse osmótico, respectivamente (Fig 18 A).

Nas brânquias posteriores dos animais expostos por 1 hora ao estresse hiperosmótico, a relação glutathiona oxidada e reduzida apresentou redução de 16 ($p < 0,05$) vezes, quando comparada àquela verificada no grupo controle (Fig. 18 B). Contudo, após 6 horas de estresse hiperosmótico a relação glutathiona oxidada e reduzida retornou a valores similares àqueles do grupo controle, porém 16 ($p < 0,05$) vezes maiores que àqueles verificados nos caranguejos expostos ao estresse de 1 hora (Fig. 18 B).

Quando comparadas às respostas aos estresses hiposmótico e hiperosmótico nas brânquias anteriores ou posteriores, foram verificadas diferenças significativas na relação glutathiona oxidada e reduzida (Figs 17 e 18).

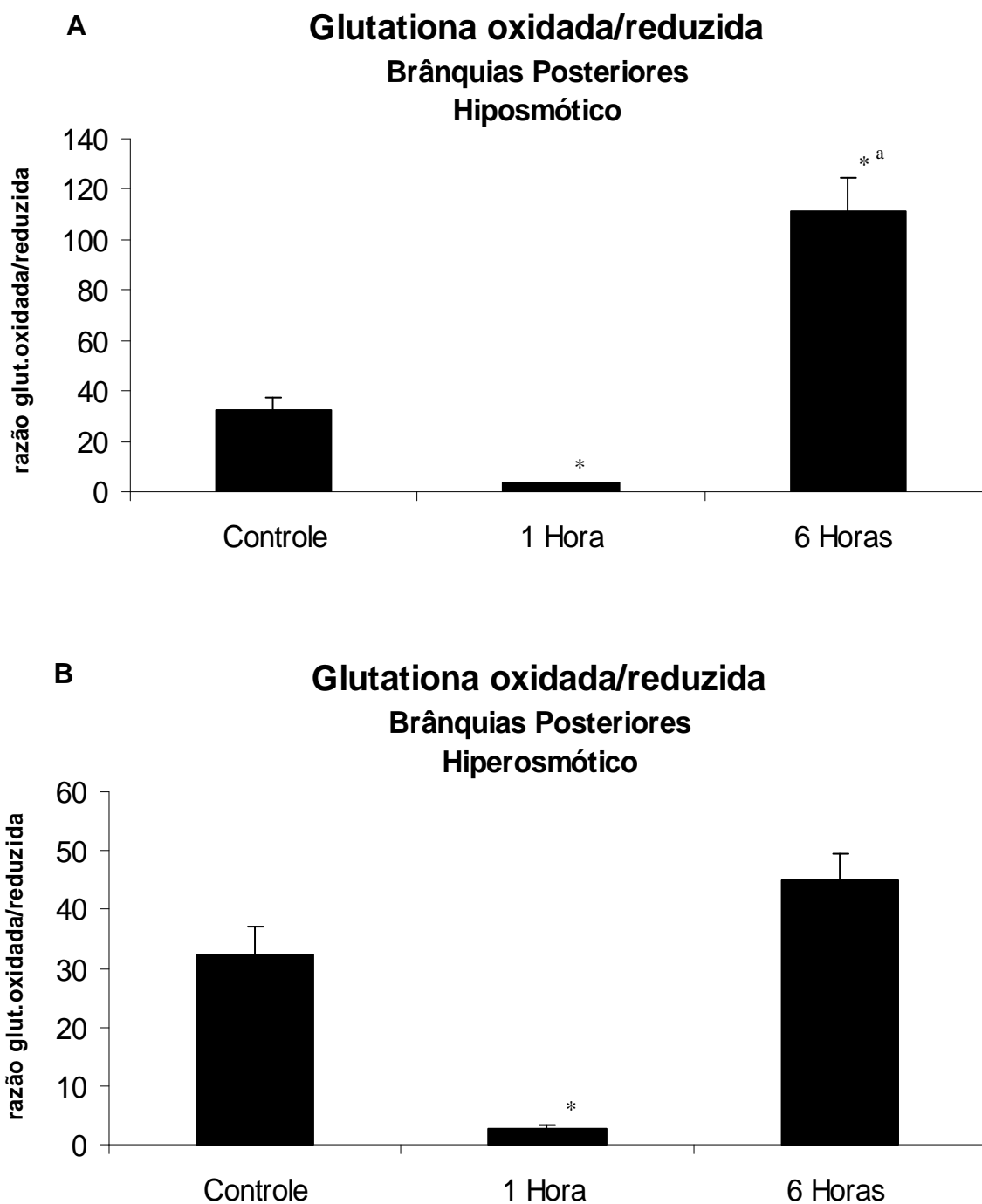


Figura 18: Relação glutaciona oxidada e reduzida nas brânquias posteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; ^a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

Não foi constatada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a relação de glutathiona oxidada e glutathiona reduzida no hepatopâncreas de caranguejos expostos por 1 hora ao estresse hiposmótico e àqueles mantidos a 20‰ (controles) (Fig. 19 A). Entretanto, após 6 horas de estresse hiposmótico a relação glutathiona oxidada e reduzida no hepatopâncreas aumentou 51 ($p < 0,05$) e 14 vezes ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e 1 hora de estresse osmótico, respectivamente (Fig. 19 A).

O estresse hiperosmótico por 1 hora não alterou significativamente a relação de glutathiona oxidada e reduzida no hepatopâncreas (Fig. 19 B). Em contraste, 6 horas de estresse hiperosmótico aumentaram 8 ($p < 0,05$) e 9 ($p < 0,05$) vezes a relação glutathiona oxidada e reduzida no hepatopâncreas, quando comparada àquelas verificadas nos grupos controle e 1 hora de estresse, respectivamente (Fig. 19 B).

Comparadas as relações glutathiona oxidada e reduzida em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no hepatopâncreas não foram verificadas diferenças significativas (Fig. 19 A e B).

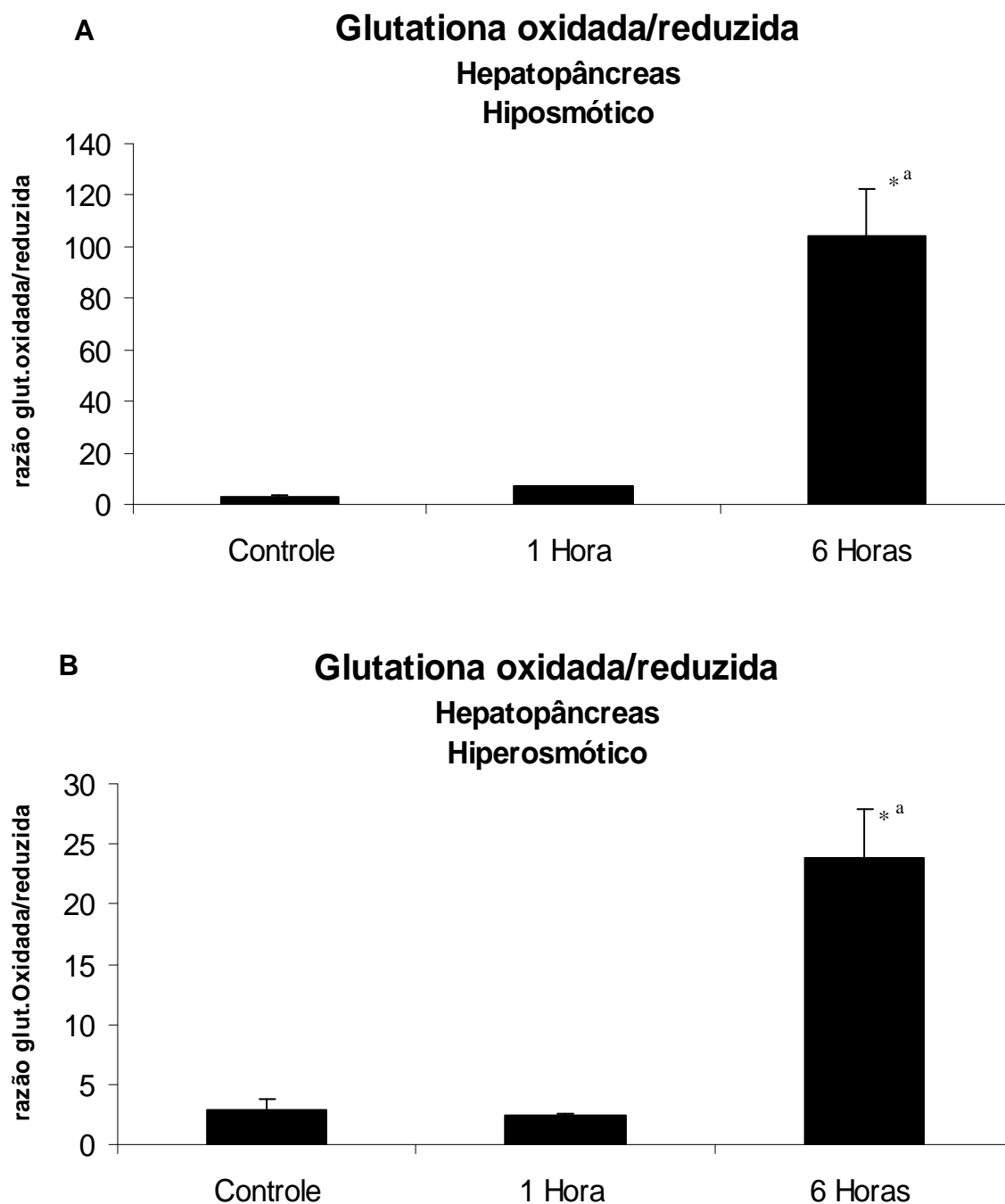


Figura 19: Relação glutathiona oxidada e reduzida nas hepatopâncreas de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A relação de glutathiona oxidada e reduzida no músculo mandibular de caranguejos expostos por 1 hora ao estresse hiposmótico foi 14 vezes ($p < 0,05$) menor, quando comparada àquela do grupo controle (Fig. 20 A). Após 6 horas de estresse hiposmótico, os valores de relação de glutathiona oxidada e reduzida no músculo mandibular aumentaram 9 ($p < 0,05$) e 138 ($p < 0,05$) vezes em relação aos grupos controle e 1 hora de estresse, respectivamente (Fig. 20 A).

O músculo mandibular de caranguejos expostos por 1 hora ao estresse hiperosmótico apresentou uma relação de glutathiona oxidada e reduzida 16 ($p < 0,05$) vezes mais baixa que àquela verificada no grupo controle (Fig. 20 B). Nos animais expostos por 6 horas ao estresse hiperosmótico a relação glutathiona oxidada e reduzida aumentou 3 ($p < 0,05$) e 49 vezes ($p < 0,05$), quando comparada àquelas dos grupos controle e 1 hora de estresse osmótico, respectivamente (Fig. 20 B).

Quando comparadas às respostas da relação glutathiona oxidada e reduzida aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no músculo mandibular não foram verificadas diferenças significativas (Fig. 20 A e B).

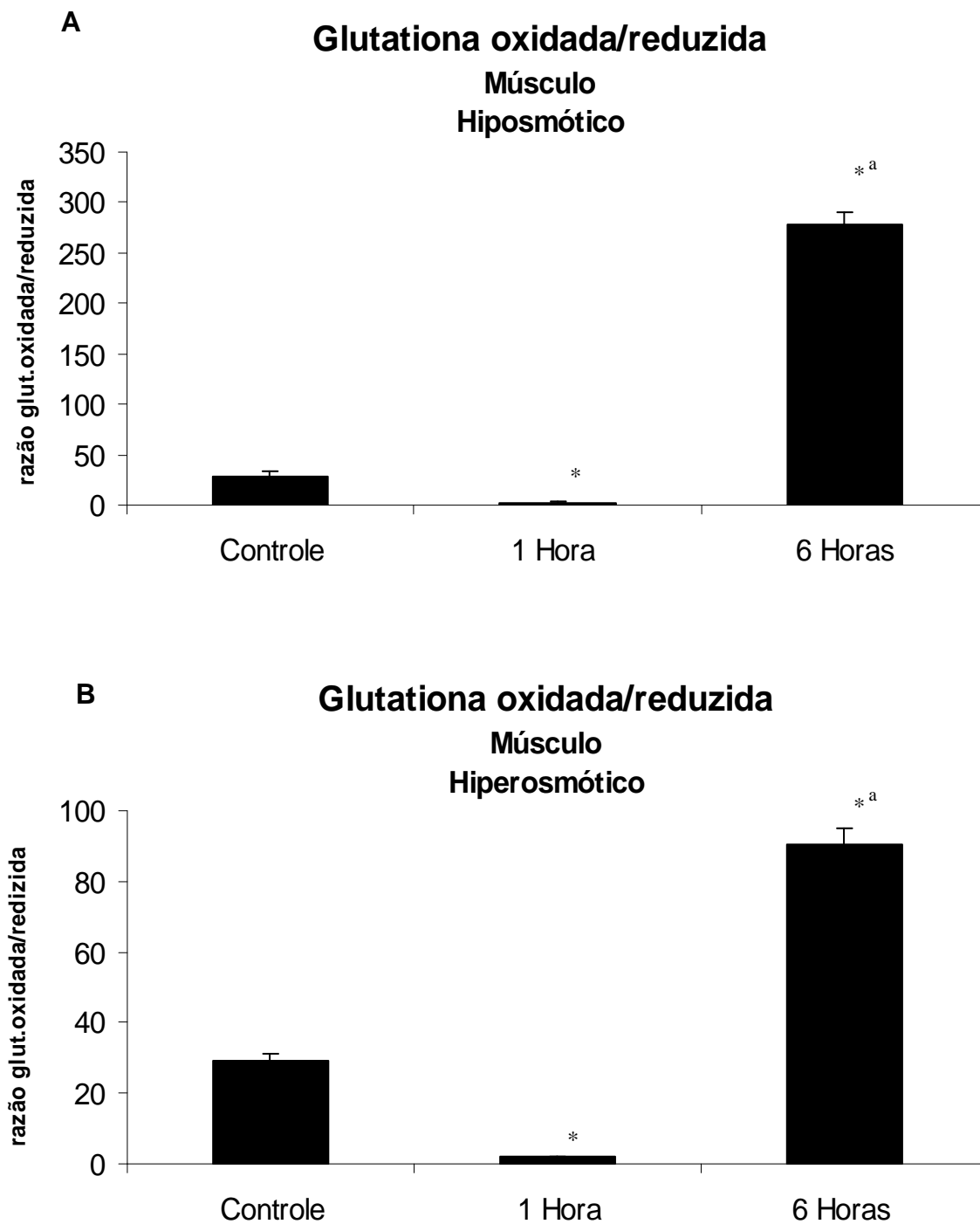


Figura 20: Relação de glutathiona oxidada e reduzida no músculo mandibular de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

ATIVIDADE DA CATALASE

Os níveis de atividade da catalase nas brânquias anteriores dos caranguejos expostos por 1 e 6 horas ao estresse hiposmótico foram, respectivamente, 2 ($p < 0,05$) e 3 ($p < 0,05$) vezes maiores que àqueles constatados nos animais controles (Fig. 21 A).

Nas brânquias anteriores dos caranguejos submetidos ao estresse hiperosmótico, a atividade da catalase aumentou cerca de 3 ($p < 0,05$) e 5 ($p < 0,05$) vezes, quando comparada à atividade verificada nos controles, após exposição por 1 e 6 horas de estresse osmótico, respectivamente (Fig. 21 B).

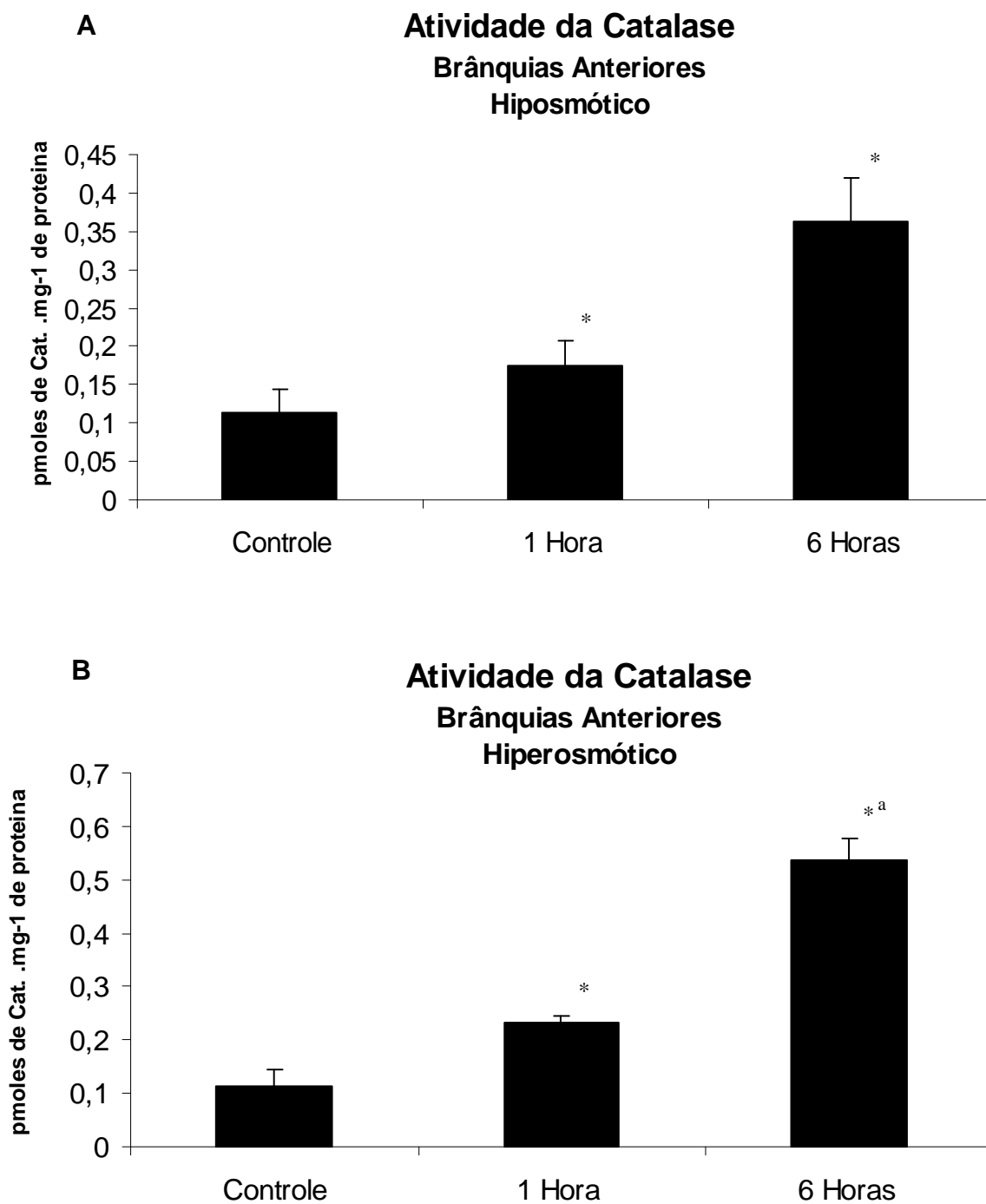


Figura 21: Atividade da catalase nas brânquias anteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; ^a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A atividade da catalase nas brânquias posteriores de *N. granulata* expostos ao estresse hiposmótico por 1 hora foram similares àquela verificada no grupo controle, entretanto, nos animais expostos por 6 horas ao estresse osmótico a atividade enzimática aumentou cerca de 3 vezes ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle e 1 hora de estresse (Fig. 22 A).

Nos animais submetidos ao estresse hiperosmótico a atividade da catalase aumenta gradualmente nas brânquias posteriores, chegando a valores 2 vezes ($p < 0,05$) maiores que àqueles verificados nos animais controles após 6 horas em meio hiper-salino (Fig. 22 B).

Não foram constatadas diferenças significativas na atividade da catalase em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico entre as brânquias anteriores e posteriores (Figs. 21 e 22). Quando comparadas as respostas aos estresses hiposmótico e hiperosmótico nas brânquias anteriores ou posteriores, não foram verificadas diferenças significativas na atividade enzimática (Figs. 21 e 22).

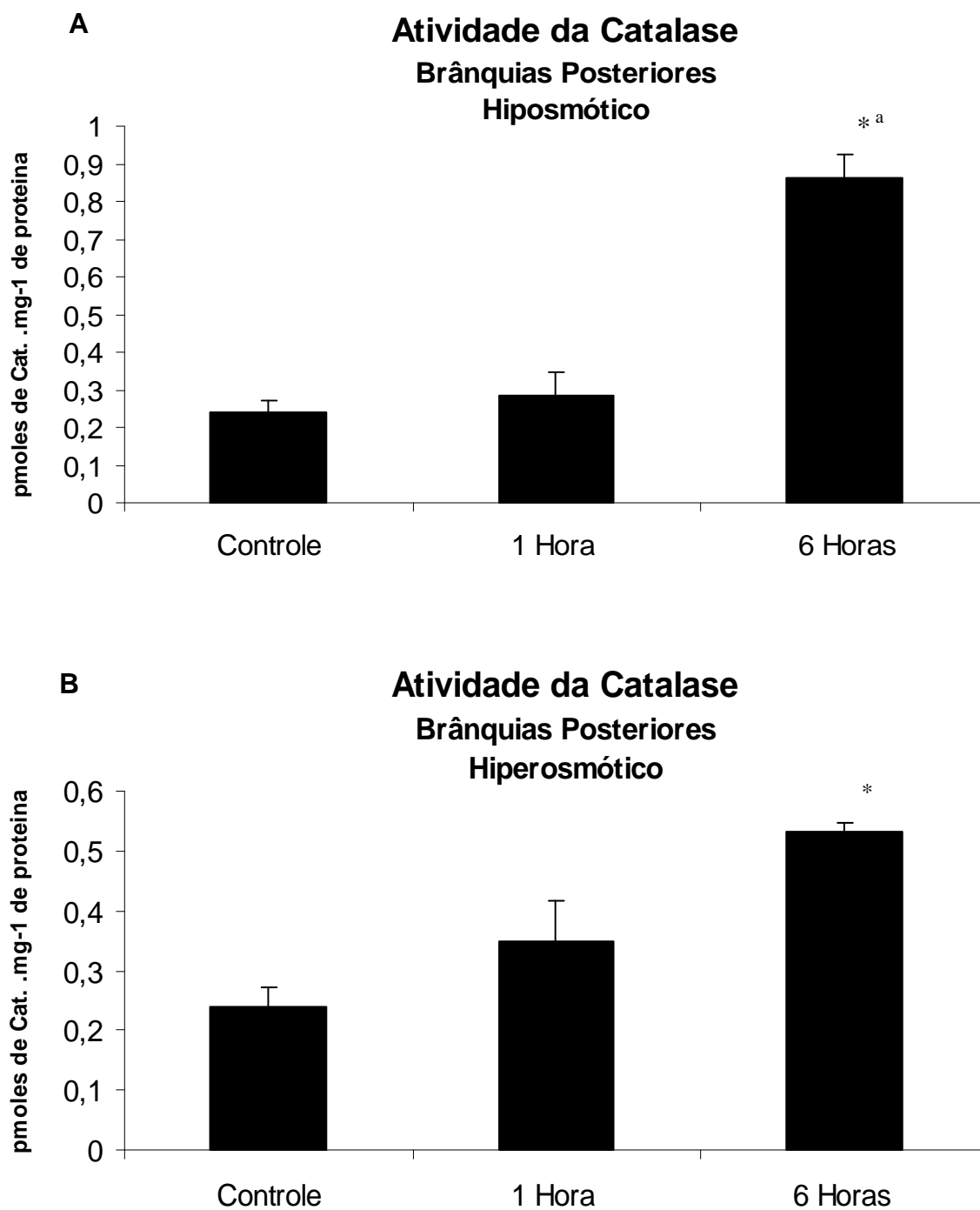


Figura 22: Atividade da catalase nas brânquias posteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; ^a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A atividade da catalase no hepatopâncreas dos caranguejos expostos ao estresse hiposmótico por 1 hora foi similar àquela do grupo controle, porém, após 6 horas em meio com salinidade nula a atividade enzimática decaiu 8 vezes ($p < 0,05$), quando comparada à atividade obtida nos caranguejos do grupo controle (Fig. 23 A).

No hepatopâncreas dos animais expostos por 1 hora de estresse hiperosmótico, a atividade da catalase diminuiu 12 vezes ($p < 0,05$) em relação àquela verificada nos caranguejos do grupo controle, permanecendo com valores significativamente mais baixos até o final do período experimental (Fig. 23 B).

Não foram constatadas diferenças significativas na atividade da catalase em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no hepatopâncreas (Fig. 23 A e B).

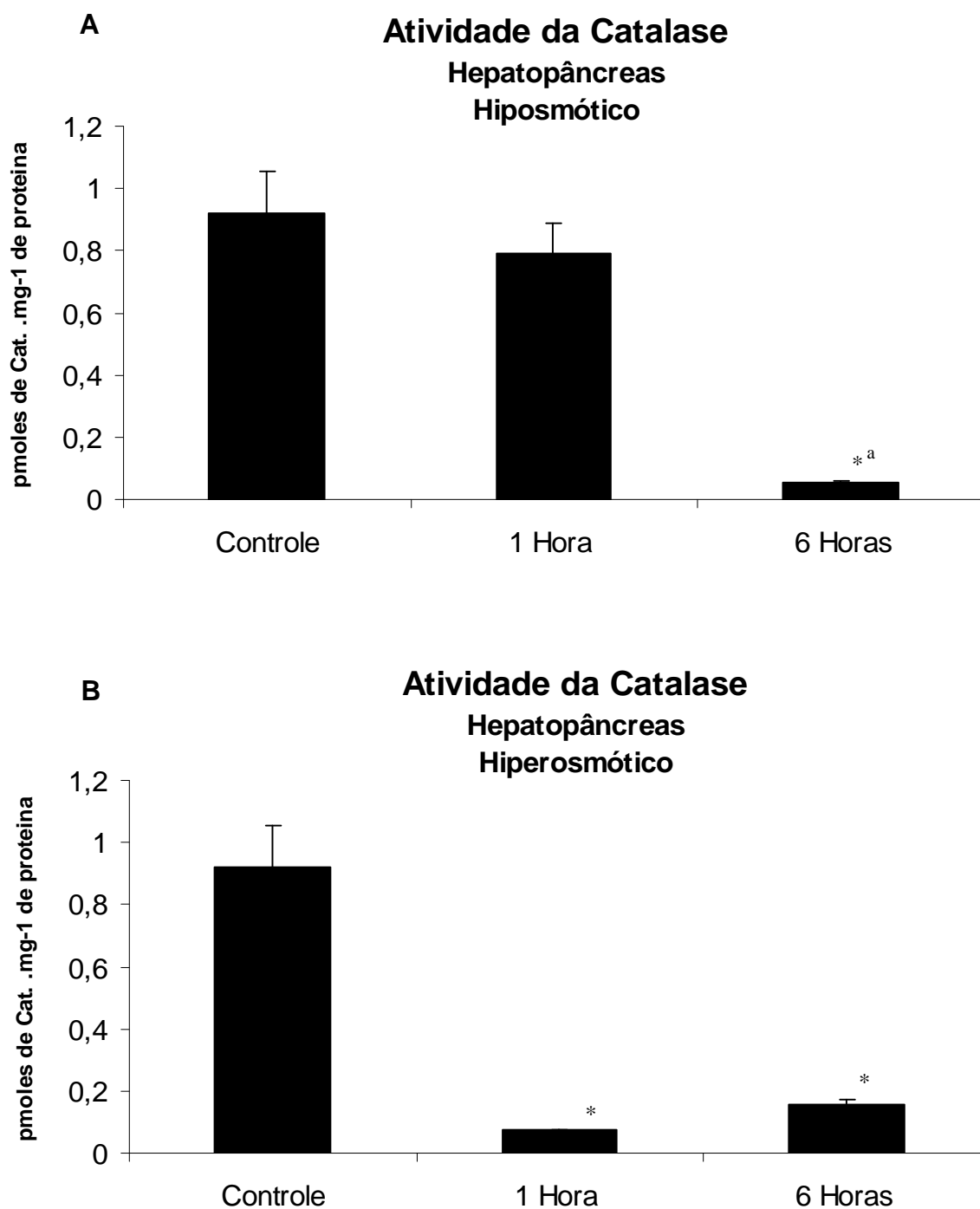


Figura 23: Níveis de atividade da catalase no hepatopâncreas de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; a $p < 0,05$ diferença em relação ao estresse de 1 hora ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

Não foi constatada alteração significativa da atividade da catalase no músculo mandibular de *N. granulata* expostos ao estresse hiposmótico por 1 ou 6 horas (Fig. 24 A).

Contrariamente, o estresse hiperosmótico por 1 hora diminuiu 4 vezes ($p < 0,05$) a atividade da catalase no músculo mandibular, quando comparada àquela do grupo controle (Fig. 24 B). Entretanto, a atividade da enzima catalase no músculo mandibular de caranguejos que permaneceram em meio hiperosmótico por 6 horas retornou a valores similares àqueles verificados nos animais controles (Fig. 24 B).

Não foram constatadas diferenças significativas na atividade da catalase em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no músculo mandibular (Fig. 24 A e B).

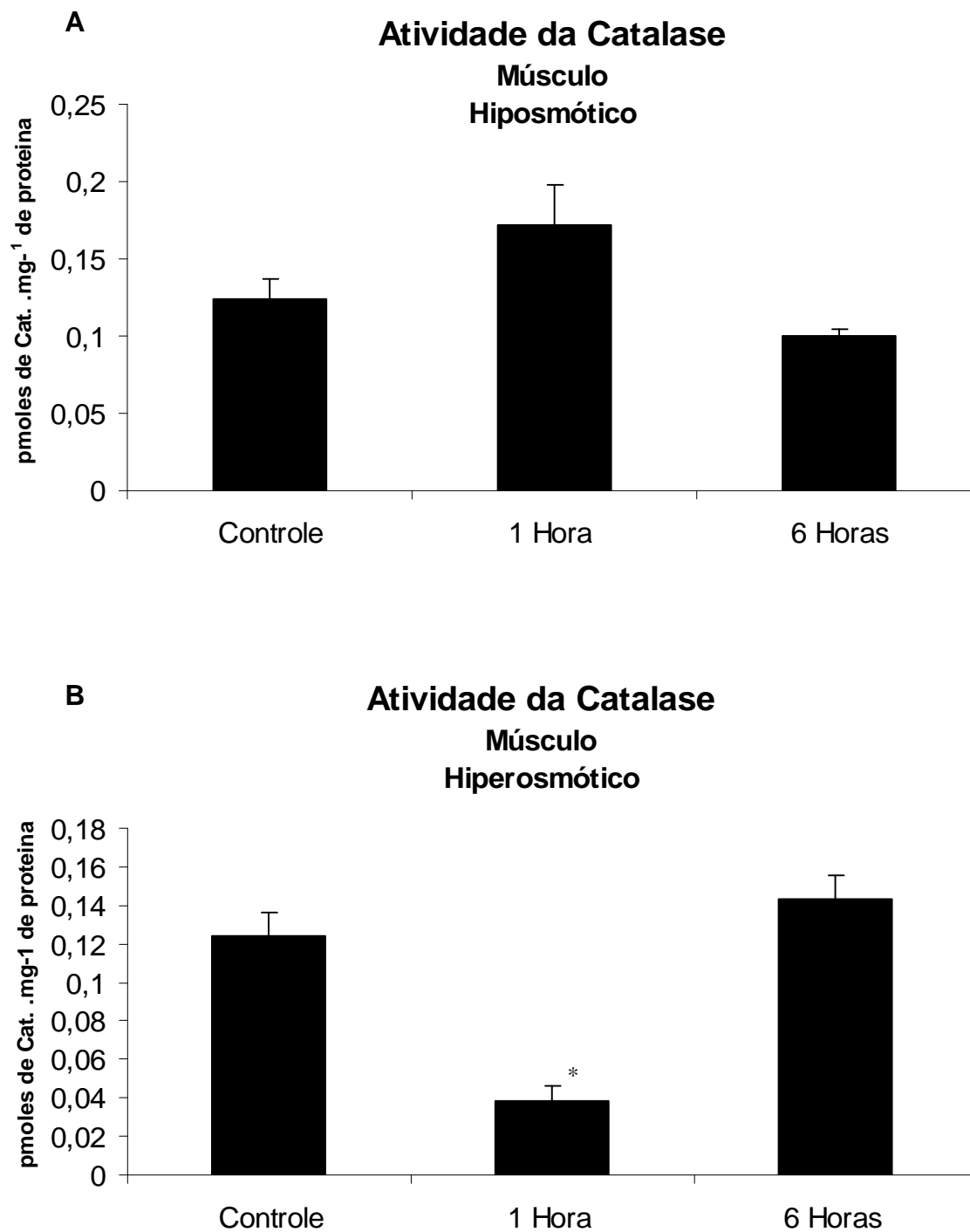


Figura 24: Atividade da catalase no músculo mandibular de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle ($n=3-5$). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

ATIVIDADE DA Na^+/K^+ ATPASE

A atividade da enzima da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias posteriores foi 38% ($p < 0,05$) maior que àquela verificada nas brânquias anteriores (Figs. 25 e 26). Nas brânquias anteriores, o estresse hiposmótico por 1 e 6 horas reduziu ($P < 0,05$) a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, quando comparada àquela verificada no grupo controle (Fig. 25 A).

Em caranguejos submetidos ao estresse hiperosmótico, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias anteriores reduziu 4 vezes ($P < 0,05$) após 1 hora de estresse (Fig. 25 B). Entretanto, quando os animais foram expostos por 6 horas ao meio hiperosmótico verificou-se aumento ($p > 0,05$) da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em relação ao grupo 1 hora de estresse, porém os valores ainda são significativamente menores que àqueles constatados no grupo controle (Fig. 25 B).

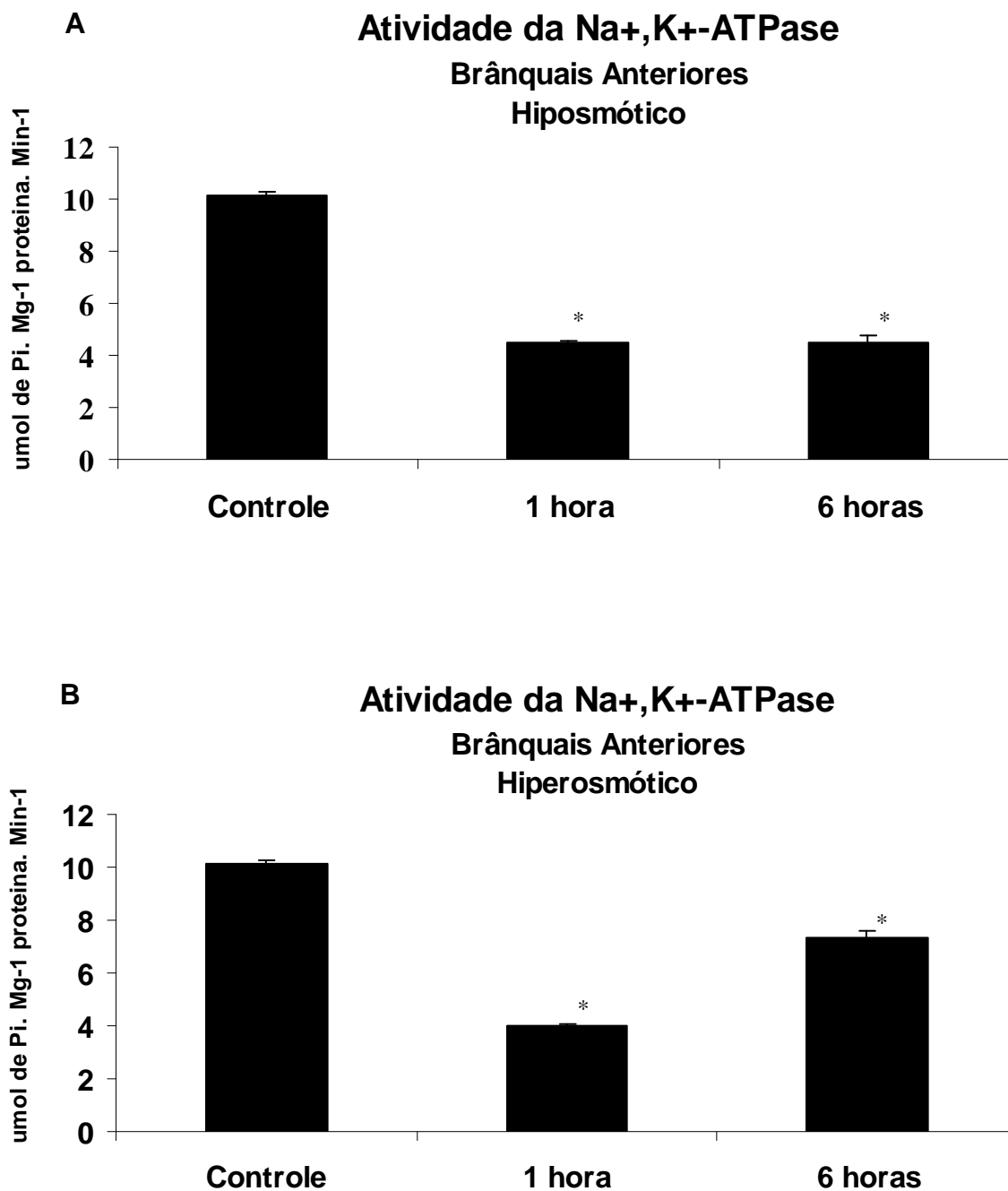


Figura 25: Atividade da Na⁺, K⁺-ATPase nas brânquias anteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. *p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias posteriores de *N. granulata* expostos ao estresse hiposmótico por 1 ou 6 horas foram 4 e 3 vezes ($P < 0,05$) menores, respectivamente, que àquela verificada no grupo controle (Fig. 26 A). Nas brânquias posteriores dos animais expostos ao estresse hiperosmótico, a atividade enzimática reduziu cerca de 3 vezes quando comparada àquela verificada no grupo controle (Fig. 26 B). Após 6 horas de estresse hiperosmóticos, os valores da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquia posteriores ainda estão significativamente menores que àqueles verificados nos controles, mas mostram uma tendência de aumento quando comparados aos valores obtidos no grupo submetido a 1 hora de estresse (Fig. 26 B).

Foram verificadas diferenças significativas na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico entre as brânquias anteriores e posteriores (Figs. 25 e 26 A e B).

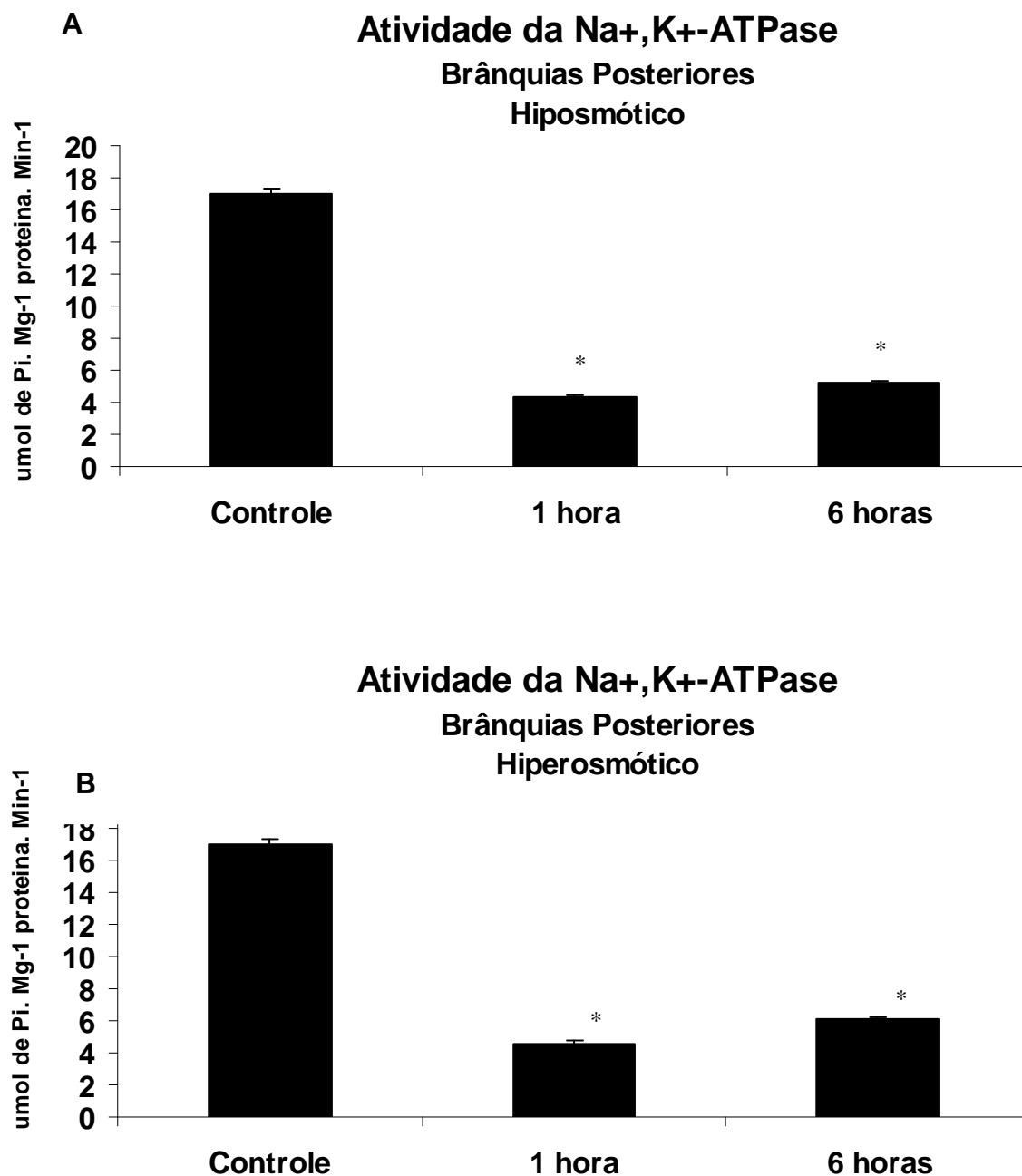


Figura 26: Atividade da Na⁺, K⁺-ATPase nas brânquias posteriores de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no hepatopâncreas de caranguejos expostos ao estresse hiposmótico por 1 ou 6 horas foi quatro vezes ($p < 0,05$) menor que àquela verificada no grupo controle (Fig. 27 A). Já no hepatopâncreas dos animais expostos por 1 hora ao estresse hiperosmótico foi observada redução de 4 vezes ($P < 0,05$) na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, quando comparada aos valores obtidos no grupo controle (Fig. 27 B). Nos animais expostos por 6 horas ao estresse hiperosmótico, a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase foi 2 vezes ($P < 0,05$) menor do que àquela do grupo controle. Entretanto, a atividade da enzima após 6 horas de estresse hiperosmótico foi o dobro ($P < 0,05$) daquela obtida após 1 hora de estresse (Fig. 27 B).

Foram constatadas diferenças significativas na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase em resposta aos estresses hiposmótico e hiperosmótico no hepatopâncreas (Figs. 27 A e B).

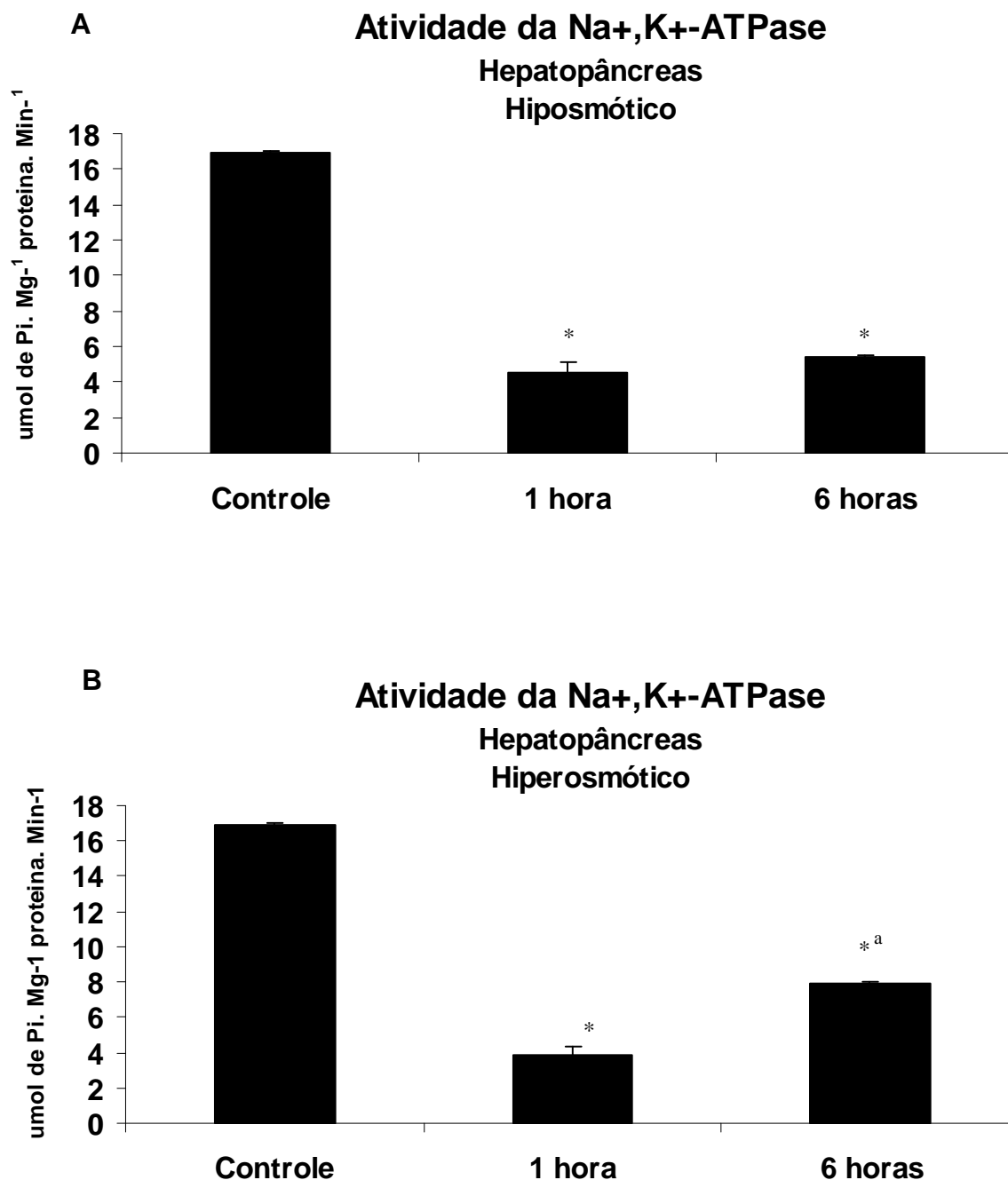


Figura 27: Atividade da Na⁺, K⁺-ATPase no hepatopâncreas de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. *p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle; ^ap<0,05 diferença em relação ao estresse de 1 hora (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase no músculo mandibular de *N. granulata* expostos ao estresse hiposmótico por 1 ou 6 horas foi 4 vezes mais baixa, quando comparada àquela verificada nos animais do grupo controle (Fig. 28 A). No músculo dos animais expostos ao estresse hiperosmótico por 1 e 6 horas foi verificado o mesmo padrão de resposta da atividade da Na^+/K^+ -ATPase obtido para o estresse hiposmótico (Fig. 28 B).

Não foram observadas diferenças significativas entre os tecidos submetidos aos dois tipos de estresse (Fig. 28 A e B).

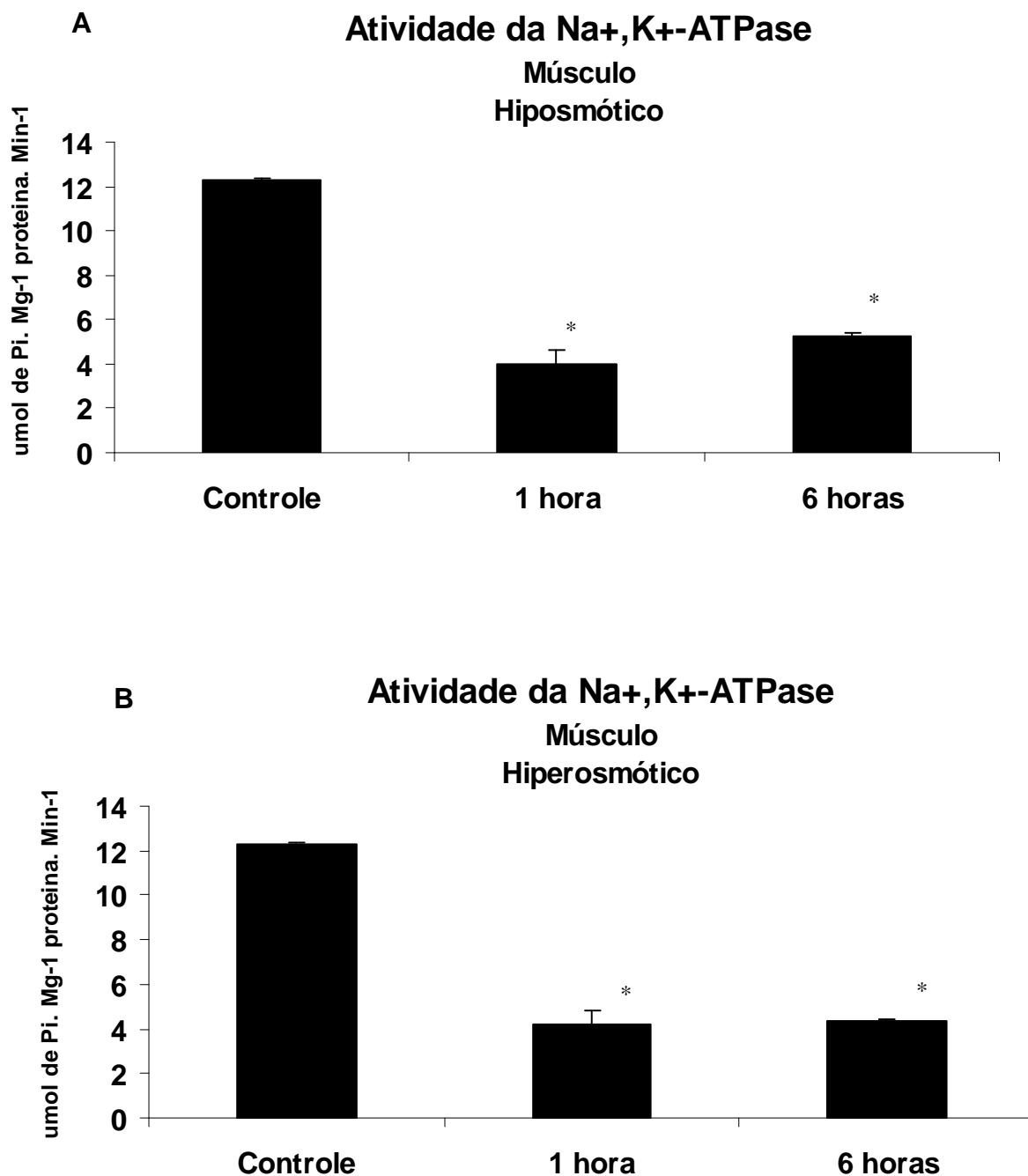


Figura 28: Atividade da Na⁺, K⁺ATPase no músculo mandibular de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico (A) ou hiperosmótico (B) por 1 e 6 horas. *p<0,05 diferença significativa em relação ao grupo controle (n=3-5). O teste utilizado foi ANOVA de uma via entre os tempos experimentais e ANOVA de duas vias para comparação entre os tipos de estresses, seguido de pós-teste de Tukey.

QUANTIFICAÇÃO DAS HSPS 70 E 90

Nas brânquias anteriores do grupo controle, não foram constatadas diferenças significativas na expressão das Hsps 70 e 90. Após 6 horas de estresse hiposmótico ou hiperosmótico não foram verificadas diferenças nas concentrações de Hsps 70 e 90 nas brânquias anteriores (Fig. 29).

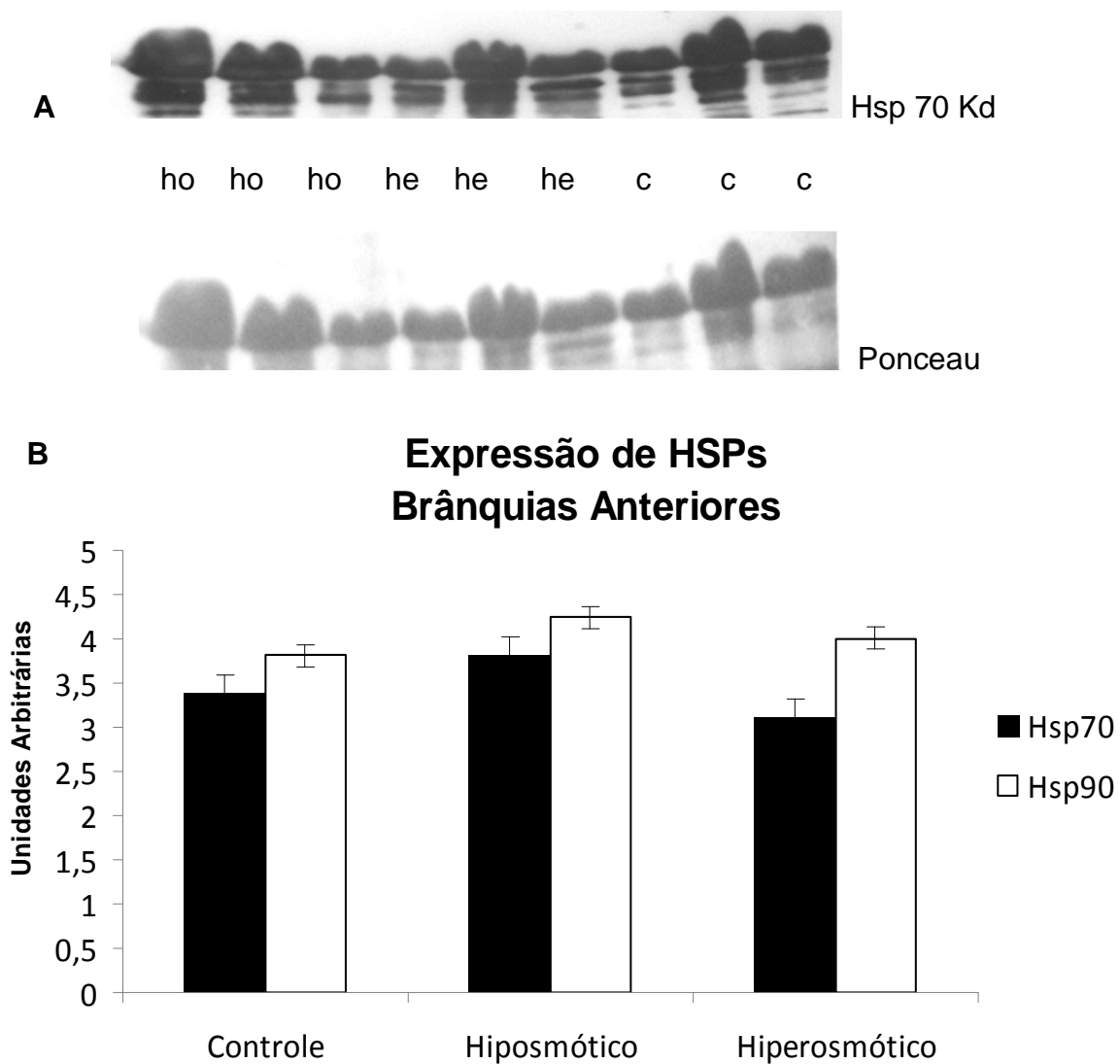


Figura 29: Expressão de Hsps 70 e 90 nas brânquias anteriores de *Neohelice granulata* no grupo controle e nos grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico por 6 horas (A- filme com bandas representativas da expressão da Hsp 70 e ponceau da mesma dos grupos controle (c), hiposmótico (ho) ou hiperosmótico (he) – B - representação em gráfico) (n=3). O teste utilizado foi o teste t de student.

As brânquias posteriores do grupo controle apresentaram a expressão de Hsp 90 significativamente maior que a de Hsp 70 (Fig. 30). Após 6 horas de estresse hiposmótico foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) dos valores de Hsp 70 nas brânquias posteriores (Fig. 30). Já a Hsp 90 não apresentou alteração significativa após 6 horas de estresse hiposmótico (Fig. 29).

No estresse hiperosmótico de 6 horas não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações das Hsps 70 e 90 nas brânquias posteriores (Fig. 30).

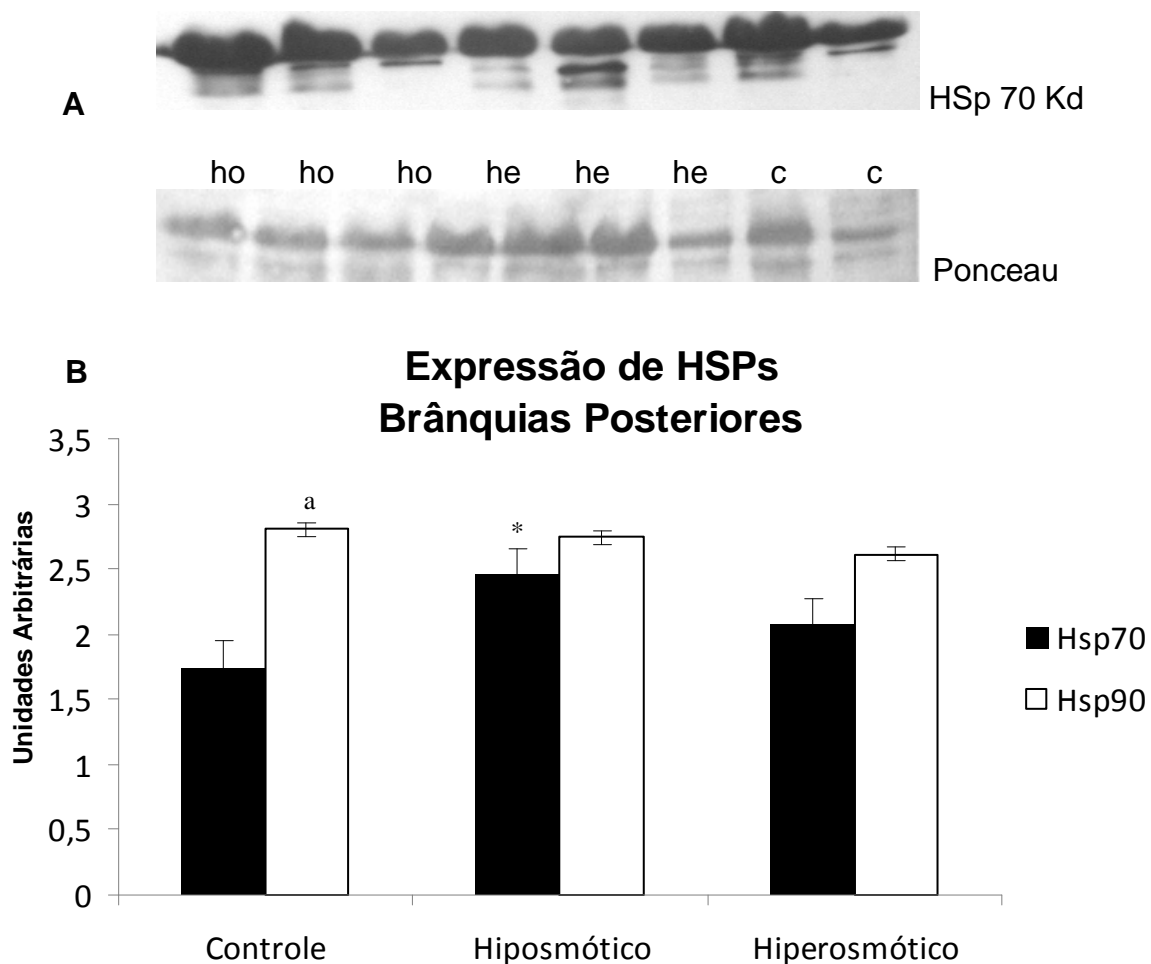


Figura 30: Expressão de Hsps 70 e 90 nas brânquias posteriores de *Neohelice granulata* no grupo controle e nos grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico por 6 horas. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo controle; a $p < 0,05$ diferença significativa em relação à Hsp 70 (A- filme com bandas representativas da expressão da Hsp 70 e ponceau da mesma dos grupos controle (c), hiposmótico (ho) ou hiperosmótico (he). B- representação em gráfico) (n=3). O teste utilizado foi o teste t de student.

No hepatopâncreas do grupo controle, os valores de Hsp 90 foram significativamente maiores que àqueles de Hsp 70 (Fig. 31).

No estresse hiposmótico e hiperosmótico não foram constatadas diferenças significativas entre as expressões de Hsp 70 ou Hsp 90 no tecido hepatopancreático, quando comparadas àquelas verificadas nos grupos controles.

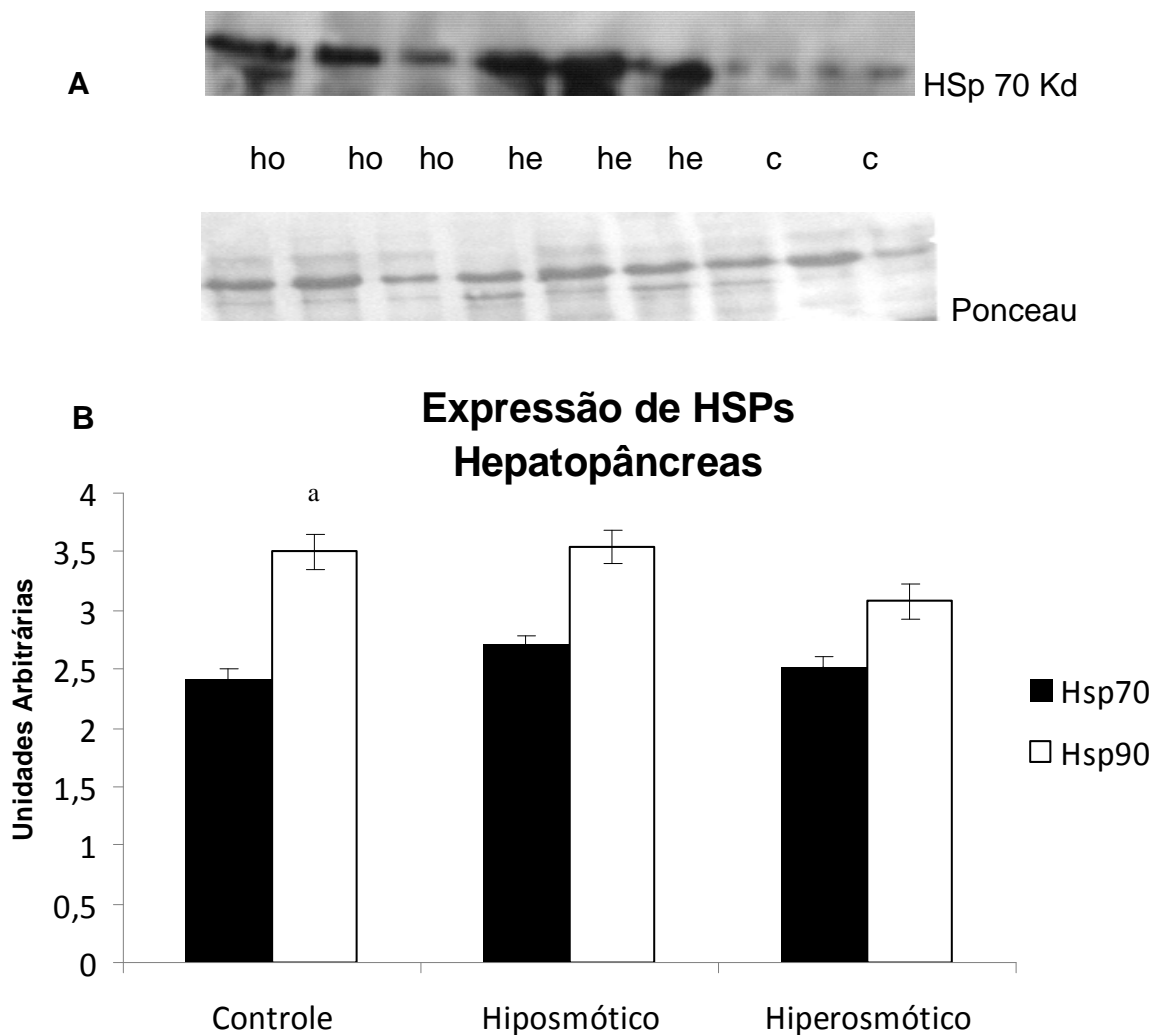


Figura 31: Concentração de Hsps 70 e 90 no hepatopâncreas de *Neohelice granulata* no grupo controle e nos grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico por 6 horas. a $p < 0,05$ diferença significativa em relação à Hsp 70 (A- filme com bandas representativas da expressão da Hsp 70 e ponceau da mesma dos grupos controle (c), hiposmótico (ho) ou hiperosmótico (he) – B - representação em gráfico) ($n=3$). O teste utilizado foi o teste t de student.

O tecido muscular apresentou uma expressão significativamente maior de Hsp 70 do que de Hsp 90 no grupo controle e após o estresse hiposmótico e hiperosmótico (Fig. 32).

Analisando a expressão de Hsps 70 e Hsp 90 no músculo mandibular, não foram verificadas diferenças entre os grupos submetidos ao estresse osmótico e o grupo controle (Fig. 32).

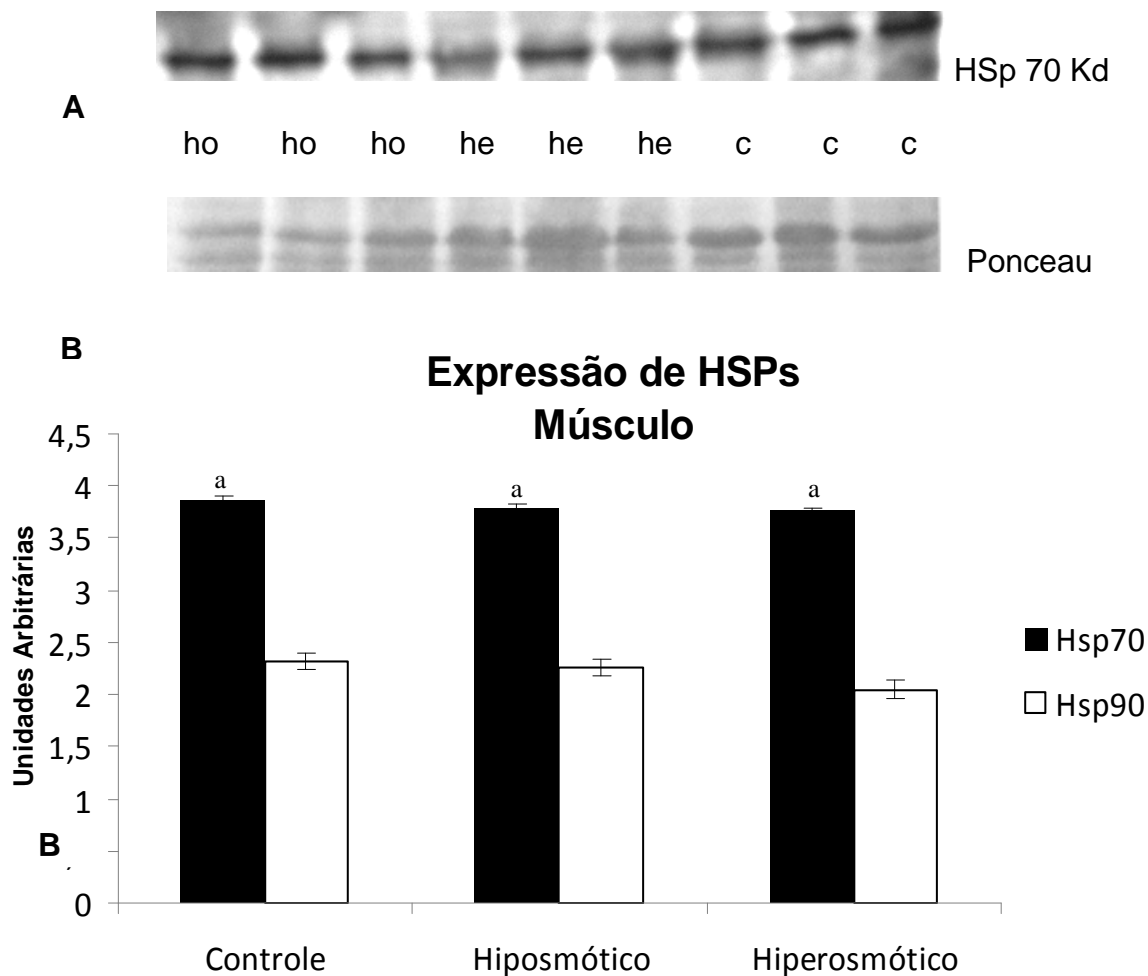


Figura 32: Níveis de Hsp 70 e 90 no músculo mandibular de *Neohelice granulata* do grupo controle e dos grupos submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico por 6 horas. a $p < 0,05$ diferença significativa em relação à Hsp 90 (A- filme com bandas representativas da expressão da Hsp 70 e ponceau da mesma dos grupos controle (c), hiposmótico (ho) ou hiperosmótico (he) – B - representação em gráfico) (n=3). O teste utilizado foi o teste t de student.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Em seu hábitat os crustáceos eurialinos estão expostos a diversas condições estressantes, como as variações de salinidade da água, de pressão parcial de oxigênio, de temperatura, de pH, de fotoperíodo e de disponibilidade de alimentos (Péqueux, 1984; Bromberg, 1992; Gilles e Delpire, 1997; Bianchini e cols., 2008). Assim, as espécies que vivem em estuários e marismas têm despertado o interesse em relação às estratégias bioquímicas, fisiológicas e morfológicas utilizadas para enfrentarem essas variáveis.

Valle e cols. (2009) demonstraram que as alterações sazonais de salinidade da água são um dos principais fatores estressantes do ambiente natural do caranguejo *N. granulata*. Organismos que vivem em condições osmoticamente instáveis, como as regiões estuarinas e intertidais, desenvolveram uma eficiente capacidade de manter o equilíbrio osmótico e de reparar danos celulares causados por condições estressantes (Bianchini e cols., 2008). Assim, em crustáceos eurialinos, como o *N. granulata*, a capacidade osmorreguladora desempenhou um importante papel na evolução e na conquista do hábitat estuarino (Bromberg, 1992). Durante o processo de aclimação ao estresse osmótico, provavelmente, o tecido branquial posterior é o que mais consome energia, uma vez que ele deve assegurar a sua regulação isosmótica do fluido intracelular, como também a regulação anisosmótica do fluido extracelular (Gilles e Delpire, 1997; Luquet e cols., 2000).

O presente estudo mostra que na primeira hora de estresse hiposmótico ou hiperosmótico a formação de peróxido de hidrogênio não se altera em brânquias anteriores de *N. granulata*, contudo, após 6 horas de estresse osmótico os valores de peróxido de hidrogênio reduzem de maneira marcante no tecido. Entretanto, nas brânquias posteriores à redução na concentração

de peróxido de hidrogênio ocorre a partir da primeira hora de estresse osmótico, permanecendo baixa até o final do período experimental.

A dosagem de peróxido de hidrogênio na água dos aquários do grupo controle e após 1 e 6 horas de estresse hiper ou hiposmótico, demonstrou a capacidade do *N. granulata* de eliminar este composto para a água. Em peixes, o peróxido de hidrogênio, por ser uma molécula que facilmente difunde-se, pode ser eliminado por difusão através das brânquias (Wilhelm-Filho e cols., 1994). Após uma hora de estresse osmótico verifica-se uma diminuição marcante dos valores de peróxido de hidrogênio na água dos aquários dos dois grupos experimentais coincidindo com a redução de peróxido de hidrogênio constatada nas brânquias posteriores. Entretanto, no período de 6 horas de estresse hiperosmótico constata-se um aumento marcante de peróxido de hidrogênio na água dos aquários dos animais submetidos ao estresse hiperosmótico, explicando os baixos níveis deste composto nas brânquias.

A redução na relação GSSG/GHS nas brânquias anteriores e posteriores durante a primeira hora de aclimação ao estresse osmótico, sugerem uma situação de estresse oxidativo nestes tecidos. O aumento da atividade da enzima CAT e, provavelmente, da glutathione redutase juntamente com a glutamato cisteína ligase, aumentando a produção de glutathione nas brânquias anteriores e posteriores, ao longo do estresse osmótico, explicaria a redução na concentração de peróxido de hidrogênio e o aumento da relação GSSG/GHS verificada após 6 horas de estresse. Este aumento da GSSG/GHS reflete o provável bloqueio do processo de peroxidação no final do período experimental. Contrariamente, no caranguejo *S. serrata* foi constatado uma redução na atividade da CAT branquial (não houve separação em brânquias anteriores e posteriores) quando os animais eram aclimatados à 35ppt por 21 dias (Paital e Chainy, 2010). Entretanto, os autores verificaram nesse caranguejo um aumento marcante na atividade da glutathione redutase (Paital e Chainy, 2010).

Em *N. granulata*, as brânquias anteriores apresentam um epitélio respiratório e não sofrem alterações significativas na sua estrutura quando ocorrem variações de salinidade no meio (Luquet e cols., 2002; Genovese e cols., 2004; Freire e cols., 2008). Estudos demonstraram que em respostas aos ajustes metabólicos necessários à aclimação às diferentes salinidades o *N. granulata* aumenta o consumo de oxigênio branquial (Bianchini e Castilho, 1999; Bianchini e cols., 2008). Assim, a atividade metabólica deste tecido aumentaria com a maior necessidade de transporte de oxigênio, contudo, estes resultados foram obtidos em *N. granulata* submetido à períodos longos (24-168h) de estresse osmótico (Bianchini e cols., 2008). Os 3 pares de brânquias posteriores, apresentam atividade osmorreguladora e, dependendo da salinidade do meio no qual se encontra o animal, o processo de transporte de cloreto de sódio pode ser ativado (meio hiposmótico) ou inibido (hiperosmótico) (Castilhos e cols., 2001; Bianchini e cols., 2008; Freire e cols., 2008). Está documentado na literatura que a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase aumenta em brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata* aclimatado à baixa salinidade por períodos longos (Castilho e cols., 2001; Freire e cols., 2008). Entretanto, quando estes caranguejos eram submetidos ao estresse hiperosmótico por longos períodos a atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase diminuía marcadamente (Castilho e cols., 2001; Bianchini e cols., 2008).

Taylor (1985) trabalhando com duas espécies de amphipoda, *Corophium volutator* e *Corophium curvispinum*, verificou uma diminuição da taxa de perfusão hemolinfática nas brânquias quando os animais eram submetidos a diferentes meios osmóticos, sugerindo que a restrição na perfusão das brânquias depende de uma mudança na magnitude iônica (NaCl), e não osmótica, do gradiente através do tegumento. Segundo o autor o padrão de perfusão é regulado em relação a salinidade ambiental através de controle neural.

Em *N. granulata* submetido a anoxia por 8 horas foi verificado um aumento significativo da CAT e da glutathione *S*-transferase (GST) das brânquias (De Oliveira e cols., 2005). Os autores sugerem que os aumentos nas atividades destas enzimas durante a anoxia seriam uma estratégia de preparação para o estresse oxidativo, com o objetivo de proteger os tecidos de um possível dano durante o período de reoxigenação na recuperação pós-anoxia (De Oliveira e cols., 2005). No caranguejo *Paralomis granulosa* também foi constatada nas brânquias um aumento da atividade da CAT após 3 e 6 horas de exposição ao ar atmosférico (Romero e cols., 2007). O mesmo mecanismo preparatório para o estresse oxidativo foi observado em land snails (Hermes-Lima e cols., 1998; Ramos-Vasconcelos et al., 2005).

Neste estudo, situação similar àquela verificada durante a anoxia parece ocorrer nas brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata* após períodos curtos de aclimação ao estresse osmótico. Nestes tecidos a atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase reduz marcadamente quando os caranguejos foram submetidos por 1 e 6 horas ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. Sabidamente em invertebrados a redução na atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase é uma estratégia para reduzir o gasto de ATP (Nilsson, 2001). Entretanto, como a enzima Na^+ , K^+ -ATPase na membrana basal é considerada a fornecedora da força motriz no processo de transporte de Na^+ na membrana apical, outros transportadores podem ser importantes no controle a curto prazo do transporte de íons, como proposto por Lucu e Towle (2003). Contudo, a hipótese de redução metabólica é fortalecida pelo fato que a osmolalidade hemolinfática dos caranguejos submetidos aos estresses hiposmótico ou hiperosmótico não foi alterada significativamente após 1 hora de choque osmótico, quando comparada àquela dos controles. Assim, uma redução de atividade de processos consumidores de energia e um aumento nas defesas antioxidantes via CAT e a reciclagem do GSSG em GSH, via glutathione reductase, aumentando a relação GSSG/GSH, permitiriam aos tecidos branquiais, anterior e

posterior, utilizarem, em períodos mais tardios de estresse, estratégias osmorregulatórias e metabólicas de mobilização de substratos energéticos no processo de aclimação ao estresse osmótico, como por exemplo, a mobilização de lipídios como fonte de energia para o esforço osmorregulatório observada em *N. granulata* (Luvizotto-Santos e cols., 2003; Chittó e cols., 2009). Em caranguejo *N. granulata*, diversos trabalhos mostram o impacto do estresse osmótico sobre a expressão e a atividade de importantes enzimas envolvidas no metabolismo intermediário durante a aclimação longa (24-144 horas) às diferentes salinidades do meio externo (Schein e cols., 2004; Schein e cols., 2005; Martins e cols., 2010).

Apesar da diferença funcional e estrutural entre as brânquias posteriores e anteriores, no presente trabalho não foram constatadas diferenças significativas na formação de peróxido de hidrogênio, na atividade da CAT ou na relação GSSG/GHS dos grupos mantidos com os mesmos parâmetros experimentais (controles). A concentração de peróxido de hidrogênio nas brânquias foi 10 e 6 vezes menor que àquelas verificadas no hepatopâncreas e no músculo, respectivamente. Este resultado sugere que as brânquias teriam um sistema anti-oxidante mais eficaz que os outros tecidos estudados.

Maciel e cols. (2004) demonstraram uma variação diária das defesas antioxidantes e da lipoperoxidação nas brânquias de *N. granulata*. Como os experimentos foram sempre realizados no mesmo horário este fator foi minimizado.

Nas brânquias dos animais controles as concentrações de Hsps 70 e 90 foram semelhantes nas brânquias anteriores. Já nas brânquias posteriores do grupo controle, a concentração de Hsp 90 foi significativamente maior que àquela da Hsp70. Geralmente nos tecidos, os valores basais de Hsp 90 são superiores àqueles de Hsp 70 (Kiang & Tsokos, 1998). Evidências demonstram que as Hsp também protegem as células, tecidos e órgãos da hipóxia e isquemia-reperfusão. O *N. granulata*, apesar de apresentar um sistema respiratório

inviável à respiração aérea (Santos e cols., 1987), é capaz de suportar longos períodos fora da água, sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon e cols., 1974). Durante esses períodos de incursão ao meio terrestre, o *N. granulata* diminui o consumo de oxigênio, aumenta os níveis de lactato circulante e reduz a mobilidade, caracterizando a hipóxia (Santos e cols., 1987; Maciel e cols., 2008). A maior concentração de Hsp 70 nas brânquias anteriores seria uma estratégia de proteção celular às alterações da concentração de O₂ ambiental. Durante o estresse osmótico (hipo ou hiperosmótico) as concentrações das Hsps 90 e 70 não se alteram nas brânquias anteriores, esses achados, pela função respiratória desse órgão. Embora, esta resposta explique, em parte, a hipótese de Feder e Hofmann (1999) que níveis mais elevados de Hsp 70 tornariam a célula mais resistente ao estresse. Ratos transgênicos, que super-expressam Hsp 70, apresentam resistência aos efeitos adversos da isquemia ou do calor (Kiang e Tsokos, 1998).

Contrariamente, o choque hiposmótico induz em brânquias posteriores de *N. granulata* aumento em cerca de 47% na concentração da Hsp 70. Estudo realizado por Frenkel e cols. (2008), em *N. granulata*, mostrou aumento significativo da expressão da Hsp 70 no sistema nervoso, após a exposição ao calor e a privação de água.

O aumento na expressão das Hsps é um bom marcador de mudanças na atividade metabólica celular. Este resultado reforça a hipótese que na primeira hora de aclimação ao estresse osmótico ocorre estresse oxidativo e redução do gasto de ATP via diminuição da atividade da bomba Na⁺, K⁺-ATPase neste tecido. Desta forma, o aumento da concentração da Hsp 70 seria um dos mecanismos de proteção celular face ao estresse oxidativo gerado pelo choque osmótico em órgão que está em íntimo contato com o meio externo, sofrendo diretamente com as variações de salinidade. Diversos estudos têm demonstrado a importância fisiológica e ecológica da expressão da Hsp 70 em resposta às alterações ambientais, tanto em

vertebrados como em invertebrados (Feder e Hofmann, 1999; Chang, 2005; Colson-Proch e cols., 2010).

Em condições de estresse salino, o tecido muscular e o hepatopancreático de *N. granulata* também participam do processo de aclimatação às diferentes salinidades, ativando ou inibindo vias metabólicas que regulam a concentração de aminoácidos intracelulares, como por exemplo, a gliconeogênese, a oxidação de aminoácidos e a lipogênese a partir de aminoácidos (Schein e cols., 2004; 2005; Martins e cols., 2010).

No presente trabalho pode-se constatar que a concentração de peróxido hidrogênio no hepatopâncreas dos animais do grupo controle é significativamente maior que àquelas verificadas no músculo e nas brânquias. Esta elevada concentração pode ser explicada, em parte, pela função metabólica deste tecido. A geração das EAOs ocorre principalmente durante o processo de oxidação biológica, dentre os quais pode-se destacar a respiração celular acoplada à fosforilação oxidativa, para a formação de ATP na mitocôndria. Apesar deste tecido apresentar os maiores valores de atividade da CAT, a relação GSSG/GHS é muito baixa, quando comparada aos outros tecidos estudados. Este tecido provavelmente apresenta baixa atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

Pigeolet (1990) descreveu uma inibição das atividades das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e glutathiona peroxidase) quando submetidas a altos índices de substâncias próoxidantes, podendo levar a um processo autocatalítico com a produção de Eaos, tendo como efeito a longo prazo a morte celular.

O músculo do caranguejo *N. granulata* do grupo controle apresenta menor concentração de peróxido de hidrogênio que o hepatopâncreas e, a atividade da CAT e a relação GSSG/GHS são semelhantes àquelas verificadas nas brânquias, sugerindo que neste tecido ocorra equilíbrio entre os fatores pró-oxidantes e os antioxidantes.

No período estudado de aclimatação às diferentes salinidades do meio, ocorreu uma redução marcante da concentração de peróxido de hidrogênio (provavelmente por redução na atividade da SOD) no hepatopâncreas e no músculo, acompanhada também por uma diminuição da atividade da CAT e uma reduzida relação GSSG/GHS. Estes resultados caracterizam um desequilíbrio entre os pró-oxidantes e os antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, que levaria ao estresse oxidativo e dano celular. Assim, a depressão metabólica parece ser uma das estratégias utilizada pelo *N. granulata* para impedir a formação de EAOs. Esta hipótese é reforçada pela redução marcante da atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase no hepatopâncreas e no músculo, o que segundo Storey e Storey (2004) seria uma estratégia para reduzir a utilização de ATP e a lipoperoxidação. Em *N. granulata*, a exposição por 8 h ao ambiente anóxico aumentou marcadamente a lipoperoxidação no hepatopâncreas (De Oliveira, 2005).

Após 6 horas de estresse osmótico os valores de peróxido de hidrogênio ainda são bastante reduzidos nos dois tecidos, contudo, no músculo e no hepatopâncreas ocorreu um aumento da relação da GSSG/GHS e da atividade da CAT no músculo. Entretanto, os valores de peróxido de hidrogênio na água do aquário estão marcadamente elevados após 6 horas de estresse osmótico, explicando parcialmente os níveis reduzidos de peróxido no hepatopâncreas e no músculo ao final do período experimental.

No presente estudo não foi verificada alteração na concentração das Hsps 90 e 70 no tecido hepatopancreático durante a aclimatação às diferentes salinidades do meio. Estes resultados sugerem que a hipótese de depressão metabólica, como estratégia de proteção contra danos celulares, seria a mais adequada para explicar a resposta do tecido hepatopancreático nas primeiras horas de choque osmótico. Quando submetidos ao estresse osmótico, os caranguejos não se alimentam e diminuem drasticamente a atividade motora nas

primeiras horas de aclimação. Spees e cols. (2002) também verificaram que o estresse hiposmótico não alterou a expressão da Hsp no hepatopâncreas da lagosta *H. americanus*. No hepatopâncreas desta lagosta o aumento da Hsp 90 ocorreu após 2 horas de choque térmico e 6 horas de recuperação (Spees e cols., 2002).

No músculo do *N. granulata*, a concentração de Hsp 70 é 38% maior que àquela de Hsp 90 em todos os grupos experimentais. Contudo, não ocorreu alteração significativa destas concentrações quando os animais foram submetidos ao estresse osmótico. Chang (2005) constatou um aumento significativo das Hsps 70 e 90 no músculo de lagosta. A lagosta em seu hábitat não está exposta às variações de salinidade testadas por Chang (2005), levando o animal à situação altamente estressante e de injúria celular. No nosso experimento utilizamos concentrações salinas mais próximas daquelas encontradas no hábitat do *N. granulata*. Provavelmente espécies que apresentam maiores níveis de expressão Hsp 70 estão submetidas, naturalmente, a condições ambientais mais variáveis, o que pode torná-las mais resistentes ao estresse (Feder e Hofmann, 1999).

Ao final deste trabalho pode-se concluir que o caranguejo *N. granulata*, no período inicial de aclimação às alterações de salinidade, possui respostas coordenadas de seus sistemas de defesas antioxidantes como estratégias para minimizar ou evitar os danos do choque osmótico. Os resultados também demonstraram que o sistema antioxidante do animal pode ser modulado durante o estresse oxidativo, contudo, a capacidade de modulação não é padronizada, sendo tecido-específica. Outra estratégia utilizada por este caranguejo em resposta ao estresse osmótico curto é uma diminuição da atividade da bomba Na^+ , K^+ -ATPase reduzindo o consumo celular de ATP.

A Hsp 70 aumenta somente nas brânquias posteriores, confirmando a afirmação de Chang (2005), que os tecidos não respondem uniformemente a um determinado estresse. No

caso do estresse osmótico cabe às brânquias posteriores uma resposta protetora devido à função de principal órgão regulador nos crustáceos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Augusto A., Greene L.J., Laure H.J., McNamara J.C.. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous, freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (Crustacea, Decapoda). *J. Crust. Biol.* 27 (2007) 626–634.
- Augusto A.S.. A invasão da água doce pelos crustáceos : o papel dos processos osmorregulatórios. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil (2005).
- Baines A., Ho P.. Glucose stimulates O₂ consumption NOS, and Na/H exchange in diabetic rat proximal tubules. *Am. J. Physiol.* 283 (2002) F286-93.
- Barnes DB. Em: *Zoologia dos Invertebrados*. Editora Roca, 4o edição. (1990) 1177 páginas.
- Barnes H., Blackstock J.. Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12 (1993) 103–118.
- Barnes R.S.K., Calow P. e Olive P.J.W.. *Os invertebrados: uma nova síntese*. São Paulo: Atheneu Editora. (1995) p. 112-113.
- Bass C.C., Luppi T., Spivak E.D.. Population structure of the South American estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Brachyura: Varunidae) near the southern limit of its geographical distribution: comparison with northern populations. *Hydrobiol.* 537 (2005) 217–228.
- Becker J., Craig E. A.. Heat-shock proteins as chaperones. *Eur. J. Biochem.* 219 (1994)11-23.
- Bianchini Adalto, Lauer M. M., Nery L. E. M., Colares E. P., Monserrat J. M., Santos E. A. F.. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 151 (2008) 423–436.
- Bond-Buckup G., Fontoura N.F., Marroni N.P., Kucharski L.C.. *O Caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia*. Editora da Universidade/UFRGS, Porto Alegre (1991) 71p.
- Botto J.L., Irigoyen H.P.. Biecológia de la comunidad del cangrejal i. contribucion al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires, Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur, Unesco-Montevideo (1980) 161–169.

- Boveris A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134(3) (1973) 707-716.
- Bradford M.M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- Bromberg E.. Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, SP, Brazil. (1992) 160 pp.
- Buranajitpirom D., Asuvapongpatana S., Weerachatanukul W., Wongprasert K., Namwong W., Poltana P., Withyachumnarnkul B.. Adaptation of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, to different salinities through an excretory function of the antennal gland. *Cell Tissue Res.* 340 (3) (2010) 481-489.
- Bötcher K.D., Siebers D.. Biochemistry, localization and physiology of carbonic anhydrase in the gills of euryhaline crabs, *J. Exp. Zool.* 265 (1993) 397–409.
- Buzzard K. A., Giaccia A. J., Killender M., Anderson R. L.. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 237 (1998) 17147-153.
- Castilho P.C., Martins I.A., Bianchini A.. Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256 (2001) 215–227.
- Cervino C., Luquet C., Haut G., Rodriguez E.. Salinity preferences of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 after long-term acclimation to different salinities, *Atlantic. 18* (1996) 69–75.
- Chan L.P., Swaminathan R.. Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination *Clin. Chem.* 32 (10) 1986.
- Chang E. S.. Stressed-Out Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins *Integr. Comp. Biol.* 45 (2005) 43–50.
- Chittó A.L.F., Schein V., Etges R., Kucharski L.C., Da Silva R.S.M.. Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. *Inv. Biol.*, 128 (2009) 261–268.
- Chung K.F., Lin H.C.. Osmoregulation and Na,K-ATPase expression in osmoregulatory organs of *Scylla paramamosain*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 144 (2006) 48–57.

- Cieluch K., Anger F., Aujoulat F., Buchholz M., Charmantier-Daures and G. Charmantier, Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Biol.* 207 (2004) 325–336.
- Colson-Proch C., Morales A., Hervant F., Konecny L., Moulin C., e Douady C.. First cellular approach of the effects of global warming on groundwater organisms: a study of the HSP70 gene expression. *Cell stress*. Chap. 15(3) (2010) 259-270.
- Cooper A.R., Morris S.. Osmotic and ionic regulation by *Leptograpsus variegatus* during hyposaline exposure and in response to emersion. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 214 (1997) 263-282.
- Copeland D.E., Fitzjarrell A.T.. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus*, Rathbun) with notes on modified mitochondria. *Z. Zellforsch.* 92 (1968) 1–22.
- Corotto F. S., C. W. Holliday.. Branchial Na⁺-K⁺ ATPase and osmoregulation in the purple shore crab (*Hemigrapsus nudus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 113 (1996) 361–368.
- Craig E. A. The heat shock response. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 18 (1985) 239-80.
- Crawford D. R., Suzuki T., Davies K.J.A.. Redox regulation of gene expression. In: Antioxidant and redox regulation of gene. (Sen, C. K., Sies, H., e Baeuerle P. A. Eds). Academic Press, San Diego (2000) 21-45.
- Cristofanon S., Dicato M., Ghibelli L., Diederich M.. Glutathione as mediator of apoptotic cell signaling pathwas. *Biochem. Pharmacol.* (2006)
- D'Incao F., Silva K.G., Ruffino M.L., Braga A.L. Hábito Alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, Dana, 1851, na Barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). *Atlântica* 12 (2) (1990) 85–93.
- Da Silva R.S.M., Kucharski L.C.R.. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate-metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate- rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A* 101 (1992) 631–634.
- Day J.W. Jr., Hall C.A.S., Kemp W.M., Vanez-arancibia A.. *Estuarin. Ecol.* J. Wiley, New York (1989) 556p.
- De Lee C.E., Bell M.A.. Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. *Trends Ecol. Evol.* 14 (1999) 284–288.
- De Oliveira U. O., Araujo A. S. R., Bello´-Klein Adriane, Da Silva R. S.M., Kucharski L. C.. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140 (2005) 51–57.

- Ding S., Wang F., Sun H., Guo B., Dong S.. Effects of Salinity Fluctuation Frequency on the Osmolarity, Na⁺-K⁺-ATPase Activity and HSP70 Expression in Juvenile Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Oceanic Coastal Sea Res.* 8 (1) (2009) 71-76.
- Drach, Tchevrigontzeff C. Sur la méthode de détermination des stages d'intermue et son application générale aux crustacés, *Vie Milieu* 18 (1967) 595–607.
- Esmann M. ATPase and Phosphatase Activity of Na⁺, K⁺-ATPase: Molar and Specific Activity, *Protein Determination. Meth. Enzimol.* 156 (1988) 105-115.
- Faleiros, R.O. Ultraestrutura, atividade enzimática Na⁺/K⁺-ATPásica e expressão de RNAm dos ionotransportadores Na⁺/K⁺-ATPase e V-ATPase nas brânquias do camarão de água doce *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda) em função da capacidade osmorregulatória. Dissertação de mestrado . Universidade de São Paulo (2007) 132 p.
- Feder E. M., Parsell A. D., Lindquist S.. The stress response and stress proteins. In: *Cell Biology of Trauma.* (Lemasters, J. J. e Oliver, C. Eds), CRC Press. Boca Raton (1995)177-191.
- Feder M.E., Hofmann G.E.. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61 (1999) 243–282.
- Feng S.H., Leu J.H., Yang C.H., Fang M.J., Huang C.J., Hwang P.P.. Gene expression of Na⁺-K⁺-ATPase α 1 and α 3 subunits in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*, adapted to different environmental salinities. *Mar. Biotechnol.* 4 (2002) 379–391.
- Ferreira, M.V.R., Alencastro, A.C.R., Hermes-Lima, M., 2003. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can. J. Zool.* 81, 1239-1248.
- Freire C. A., Amado E. M., Souza L. R., Veiga M. P.T., Vitule J. R.S., Souza M.M., Prodocimo V.. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of hábitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 149 (2008) 435–446.
- Freire C. A., Mcnamara J. C. Involvement of the central nervous system in neuroendocrine mediator of osmotic and ionic regulation in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (crustacea, decapoda). *Gen. Comp. Endocrinol.* 88 (1992) 316-327.

- Freire C.A., Cavassin F., Rodrigues E.M., Torres A.H., McNamara J.C.. Adaptive patterns of osmotic and ionic regulation, and the invasion of fresh water by the palaemonid shrimps. *Comp. Biochem. Physiol. A* 136 (2003) 771-778.
- Freire C.A., Onken H., McNamara J.C.. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol.*, (2006) Submitted
- Frenkel L., Dimant B., Portiansky E.L., Maldonado H., Delorenzi A. Both heat shock and water deprivation trigger Hsp70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus* *Neurosc. Let.* 443 (2008) 251–256.
- Geihs M.A., Vargas M.A., Maciel F.E., Caldas S.S., Cruz B.P., Primel E.G., Monserrat J.M., Nery L.E.M.. Effect of melatonin in the antioxidant defense system in the locomotor muscles of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura). *Gen. Comp. Endocrinol.* 166(1) (2010) 72-82.
- Genovese G., Luchetti C. G., Luquet C. M.. Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Mar. Biol.* 144 (2004) 111–118.
- Genovese G., Ortiz N., Urcola M.R., Luquet C.M.. Possible role of carbonic anhydrase, V-H⁺-ATPase, and Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger in electrogenic ion transport across the gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 142 (2005) 362–369.
- Gilles R., Delpire E. Variations in salinity, osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates. In: W.H. Dantzler, Editor, *Handbook of Comparative Physiology* 2, Oxford University Press, New York (1997) 1523–1586.
- Gouveia G.R., Marques D.S., Cruz B.P., Geracitano L.A., Nery L.E.M., Trindade G.S.. Antioxidant defenses and DNA damage induced by UV-A and UV-B radiation in the crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Photochem. Photobiol.* 81(2) (2005) 398-403.
- Grigore M., Indrei A.. The role of heat shock proteins in reproduction. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi* 105 (2001) 674-6.
- Gulbins E., Welsch J., Lepple-Wienhuis A., Heinle H., Lang F. Inhibition of Fas-induced apoptotic cell death by osmotic cell shrinkage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236(2) (1997) 517-21.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B.. Glutathione S-transferases. The first big WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The firenzymatic step in mercapturic acid enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249 (25) (1974) 7130-7139.

- Halliwell B., Gutteridge J.C.M.. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press, New York (1999).
- Halliwell B.. The antioxidant paradox. *Lancet* 355 (2000) 1179 – 1180.
- Hartnoll R.G.. Growth and molting. In: Burggren W.W., McMahon B.R. eds. *Biology of the land crabs*. Cambridge University, New York. (1998) 186-210.
- Haussinger D., Laubenberger J., vom Dahl S., Ernst T., Bayer S., Langer M., Gerok W., Hennig J.. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterol.* 107(5) (1994) 1475-80.
- Haussinger D., Kubitz R., Reinehr R., Bode J.G., Schliess F.. From experimental to clinical hepatology. *Mol Aspects Med* 25 (2004) 221–360.
- Henry R.P., Wheatly M.G.. Interaction of respiration ion regulation, and acid-base balance in the everyday life of aquatic crustaceans. *Amer. Zool.* 32 (1992) 407-416.
- Henry R.P., Garrelts E.E., McCarty M.M., Towle D.W.. Differential induction of branchial carbonic anhydrase and Na⁺/K⁺ ATPase activity in the euryhaline crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity exposure. *Exp. Zool.* 292 (2002) 595–603.
- Hermes-lima M., Storey J.M., Storey K.B.. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. (Review Article). *Comp. Biochem. Physiol.* 120 B (1998) 437-448.
- Hermes-lima M., Gonçalves M.S. RG A.J.. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated free radical formation. *Mol. Cel. Biochem.* 228 (2001) 73-82.
- Jobling M., Jobling In: *Environmental Biology of Fishes*, Chapman e Hall, London (1995) p. 455.
- Kiang J.G., Tsokos G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Therap.* 80 (2) (1998) 183-201.
- Kucharski L.C.R.. Insulina: Presença de receptores e efeito biológico em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (thesis). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil (1997).
- Kumlu M., Eroldoğan O.T., Aktas M.. The effects of salinity on larval growth, survival and development of *Penaeus semisulcatus* (Decapoda: Penaeidae). *Isr. J. Aquac.-Bamidgeh* 51(3) (1999) 114-121.

- Laemmli E.K.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227 (1970) 680–685.
- Lamitina S.T., Strange K.. Transcriptional targets of DAF-16 insulin signaling pathway protect *C. elegans* from extreme hypertonic stress. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 288 (2005) C467–C474.
- Lang F., Busch G.L., Ritter M., Volkl H., Waldegger S., Gulbins E., Haussinger D.. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. *Physiol. Ver.* 78 (1998) 247–306.
- Lee T.H., Tsai J.C., Fang M.J., Yu M.J., Hwang P.P.. Isoform expression of Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Am J Physiol* 44 (1988) R926-932.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M.. *Princípios de Bioquímica*. 2^a ed. Editora Sarvier. São Paulo (1995).
- Lemos D., Phan V.N., Alvarez G.. Growth, oxygen consumption, ammonia-N excretion, biochemical composition and energy content of *Farfantepenaeus paulensis* Pérez-Farfante (Crustacea, Decapoda, Penaeidae) early postlarvae in different salinities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 261 (2001) 55-74.
- Lindquist S., Craig E.A.. The heat-shock proteins. *Ann.l Rev. Gen.* 22 (1988) 631–677.
- Lindquist S., Craig, E.A.. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22 (1988) 631-77.
- Lingrel J.B., Kuntzweiler T.. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 269 (1994) 19659-19662.
- Livingstone D.R.. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42 (2001) 656-666.
- Livingstone D.M.. Impact of secular climate change on the thermal structure of a large temperate central European lake. *Clim. Change* 57 (2003) 205–225.
- Lopez-Bueza P., Pfond C., Craig E. A.. The biochemical properties of the ATPase activity (Hsp70) are governed by the C-terminal domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998)15253-258.
- Lovett D.L., Verzi M.P., Clifford P.D., Borst D.W.. Hemolymph levels of methyl farnesoate increase in response to osmotic stress in the green crab *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 128 (2001) 299–306.
- Lovett D.L., Ricart T.M., Tanner C.A., Towle D.W.. Chronic exposure of the blue crab, *Callinectes sapidus*, to low salinity stimulates expression of Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit mRNA and protein in gills. *Integr. Comp Biol* 42 (2002) 1269-1269.

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- Lu A., Ran R., Parmentier-Batteur S., Nee A. and Sharp F. R.. Geldanamycin induces heat shock proteins in brain and protects against focal cerebral ischemia. *J. Neurochem.* 81 (2010) 355–364.
- Lucu C., Towle D.W.. Na⁺,K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135 (2003) 195–214.
- Lucu C., G. Flik.. Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ Exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. *Am. J. Physiol.* 276 (1999) R490–R499.
- Lunz W., Natali A.J.. Exercício e proteínas de estresse (Hsp 72) no músculo cardíaco. *Rev. bras. ciênc. mov*;13(3) (2005) 89-98.
- Luquet C. M., Rosa G. A., Ferrari C.C., Genovese G. and Pellerano G. N.. Gill morphology of the intertidal estuarine crab *chasmagnathus granulatus* dana, 1851 (decapoda, grapsidae) in relation to hábitat and respiratory habits. *Crust.* 73 (1) (2000) 53-67.
- Luquet C. M., Weihrauch D., Senek M. and Towle D. W.. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*. *J. Exp. Biol.* 208 (2005) 3627-3636.
- Luquet C.M., Postel U., Halperin J., Urcola M.R., Marques R., Siebers D.. Transepithelial potential differences and Na⁺ flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. *J. Exp. Biol.* 205 (2002) 71–77.
- Luvizotto-Santos R., Lee J.T., Branco Z.P., Bianchini A., Nery L.E.M.. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295 A (2003) 200–2005.
- Maciel F.E., Rosa C.E., Santos E.A., Monserrat J.M., Nery L.E.M. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab, *Can. J. Zool.* 82 (2004) 1871–1877.
- Maciel F.E., Geihs M.A., Monserrat J.M., Nery L.E.M.. Antioxidant defense system rhythms in crustaceans and possible roles for melatonin. *Frontiers in bioscience (Elite edition)* 2 (2010) 1448-59.
- Maciel, J.E.S., Souza F., Valle S., Kucharski L.C., Da Silva R.S.M. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery *Comp. Biochem. Physiol. A* 151 (1) (2008) 61-65.

- Mañe-Garzon F., Dei-Cas E., Hollman-Spector B., Leymonie J.. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulación frente a cambios de salinidad. *Physis* 33^a (1974) 163–171.
- Manães A.A.L., Meligeni C.D., Goldemberg A.L. Response to environmental salinity of Na⁺–K⁺ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 274 (2002) 75– 85.
- Mantel L.H., Farmer L.L.. Osmotic and ionic regulation. In: Vernberg, F.J., Vernberg, W.B. (Eds.), *The Biology of Crustacea*, vol. 5. Academic Press, New York (1983) 53–161.
- Manzoni, J., D’Incao, F. Bioecologia dos crustáceos decápodos: proposta para ambientalização de currículo. *Ver. Elet. CAD. Ecol. Aqu.* 2 (1) (2007) 13-18.
- Martin J.W.; G.E. Davis. An updated classification of the recent Crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series*, Los Angeles, 39 (2001) 1-124.
- Martins T. L., Chittó A.L., Rossetti C., Brondani C., Kucharski L.C., Da Silva R.S.M.. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A* (2010) In press.
- Masui D.C., Furriel R.P.M., Silva E.C.C., Mantelatto F.L.M., McNamara J.C., Barrabin H., Scofano H.M., Fontes C.F.L., Leone F.A. Gill microsomal (Na⁺, K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: interactions at cationic sites. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 2521–2535.
- McNamara J.C., Greene L.J., Rosa J.C., Augusto A.. Adjustment of free amino acid pools in different tissues and hemolymph of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during salinity acclimation. *Mar. Freshw. Beh. Physiol.* 37(3) (2004) 193 – 208.
- McNamara J.C., Salomão L.C., Ribeiro E.A.. The effect of eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic concentrations during acute salinity exposure in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *Hydrobiol.* 199 (1990) 193-199.
- McNamara J.C.; Salomão L.C., Ribeiro E.A.. Neuroendocrine regulation os osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda) *Gen. Comp. Endocrinol.* 84 (1991) 16-26.
- McNamara J.C., Torres A.H.. Ultracytochemical location of Na⁺/K⁺- ATPase activity and effects of high salinity acclimation in gill and renal epithelia of the freshwater

- shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Zool. 284 (1999) 617–628.
- Mo J.L., Devos P., Trausch G.. Dopamine as a modulator of ionic transport and Na⁺/K⁺-ATPase activity in the gills of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. J Crustacean Biol 18 (1998) 442-448.
- Mo J.L., Greenaway P.. cAMP and sodium transport in the freshwater crayfish, *Cherax destructor*. Comp. Biochem. Physiol. A 129 (2001) 843-849.
- Mo J.L., Devos P., Trausch G.. Dopamine D-1 receptors in the gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*. Comp. Biochem. Physiol. C 131 (2002) 433-438.
- Morris S.. Neuroendocrine regulation of osmoregulation and the evolution of air-breathing in decapod crustaceans. J. Exp. Biol. 204(5) (2001) 979–989.
- Mosser D. D., Caron A. W., Bourget L., Denis-Larose C., Massie B.. Role of the human heat shock protein Hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. Mol. Cell. Biol. 17 (1997) 5317-327.
- Nan F.H., Hong M.H., Lu C.L., Sheen S.S.. The effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation on haemolymph osmotic and ionic regulation and Gill Na⁺, K⁺-atpase activity in *Marsupenaeus japonicus* (Bate, 1888) (Decapoda, Natantia). Crustac. 77 (4) (2004) 385-395.
- Nilsson, G.E. Surviving anoxia with the brain turned on. News Physiol. Sci. 16 (2001) 218–221.
- Nery L.E.M., Santos E.A.. Carbohydrate-metabolism during osmoregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. B 106 (1993) 747–753.
- Neufeld G. J., Holliday C.W., Pritchard J.B. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab *Callinectes sapidus*. J. Exp. Zool. 211 (1980) 215-224.
- Novo M.S., Miranda R.B., Bianchini A.. Sexual and seasonal variations in osmoregulation and ionoregulation in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323 (2005) 118–137.
- Odum E.P.. Ecologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1983).
- Odum E.P.. Ecologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro (1988).
- Oliveira G.T., Da Silva R.S.M.. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets Comp. Biochem. Physiol. B: 127 (3) (2000) 375-381.

- Orbea A., Fahimi H.D., Cajaraville M.P.. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of molluscs and crustaceans and fish liver. *Histochem. Cell Biol.* 114 (2000) 393–404.
- Paital B.; Chainy G.B.N.. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity *Comp. Biochem. Physiol. C* 151 (1) (2010) 142-151.
- Paller M.S.. Lateral mobility of Na,K-ATPase and membrane lipids in renal cells. Importance of cytoskeletal integrity. *J. Membr. Biol.* 142 (1994) 127–135.
- Pasantes-Morales H., Lezama R.A., Ramos-Mandujano G.. Mechanisms of cell volume regulation in hypo-osmolality. *AM. J. Med.* 119 (2006) S4–S11.
- Pequeux A., Marchai A., Wanson S., Gilles R. Kinetics characteristics and specific activity of gill (Na⁺, K⁺) ATPase in the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis* during salinity acclimation. *Mar. Biol. Lett.*, 5 (1984) 35-45.
- Péqueux A. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15 (1995) 1–60.
- Pick E., Kotkes P. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38: 161-170.
- Pigeolet E., Corbisier P., Houbion A., Lambert D., Michiels C., Raes M., Zachary M., Remacle J. Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech. Ag. Develop.* 51 (3) (1990) 283-297.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M., 2005. Seasonal modulation of the free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140C, 165-174.
- Richards J.G., Semple J.W., Bystriansky J.S., Schulte P.M., Na⁺/K⁺-ATPase (alpha-isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 4475-4486.
- Ricklefs R. E.. *A economia da natureza*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro. (2003) 503p.
- Romero M.C., Ansaldo M., Lovrich G.A.. Effect of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulosa* (Decapoda: Anomura). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 146 (2007) 54–59.
- Santos E.A., Baldisseroto B., Bianchini A., Colares E.P., Nery L.E.M., Manzoni G.C.. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A* 88 (1987) 21–25.

- Santos E.A., Nery L.E.M.. Blood-glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. *Comp. Biochem. Physiol. A* 87 (1987) 1033–1035.
- Santos F.H. e McNamara J.C.. Neuroendocrine modulation of osmoregulatory parameters in the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). *J. Exp. Mar. Biol Ecol* 206 (1996) 109-120.
- Souza L.R.. Alterações Fisiológicas E Bioquímicas No Peixe-Rei Estuarino (*Atherinella brasiliensis*, Atheriniformes: Atherinopsidae) Após A Explosão Do Navio Vicuña Na Baía De Paranaguá, Paraná, Brasil. Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná (2007).
- Sarver R.G., M.A. Flynn, C.W. Holliday. Renal Na,K-ATPase and osmoregulation in the crayfish, *Procambarus clurkii*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 107A (1994) 349-356.
- Schein V., Chittó A.L.F., Etges R., Kuscharski L.C., Wormhoudt A., Da Silva R.S.M. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* seasonal differences. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 316 (2005) 203–212.
- Schein V., Wache Y., Etges R., Kucharski L.C., vanWormhoudt, A., Da Silva, R.S.M.. Effect of hyperosmotic on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Letter* 561 (2004) 202–206.
- Schleich C.E., Goldemberg L.A., Mananes A.A.L.. Salinity dependent Na⁺-K(+)ATPase activity in gills of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata*. *Gen. Physiological. Biophysical.* 20 (2001) 255–266.
- Schmidt-Nielsen K.. *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*, 5th ed. Editora, Santos (1996).
- Schubart C.D., Diesel R.. Osmoregulatory capacities and penetration into terrestrial habitats: a comparative study of Jamaican crabs of the genus *Armases Abele*, (Brachyura: Grapsidae: Sesarinae). *Bul. Mar. Sci.* 63 (2) (1998) 743-752.
- Setiarto A., Strussmann C.A., Takashima F., Watanabe S., Yokota D.M.. Short-term responses of adult kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* (Bate) to environmental salinity: osmotic regulation, oxygen consumption and ammonia excretion. *Aquac. Res.* 35 (2004) 669-677.
- Sharp F. R., Massa S. M., Swanson R. A.. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosc.* 22 (1999) 97-99.

- Sharp F. R.. Stress proteins are sensitive indicators of injury in the brain produced by ischemia and toxins. *J. Toxicol. Sc.* 20 (1995) 450-53.
- Siebers D., A. Winkler K. Leweck, A. Madian.. Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Helgol. Meeresunters.* 36 (1983) 303–312.
- Sies H., Cadenas E.. Oxidative Stress: damage to intact cells and organs. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 311 (1985) 617-31.
- Signoret G., Brailovsky D.. Adaptive osmotic responses of *Macrobrachium acanthurus* (Wiegmann) and *Macrobrachium carcinus* (Linnaeus) (Decapoda, Palaemonidae) from the southern gulf of Mexico. *Crust.* 77 (2004) 455-465.
- Singal P.K., Li T., Kumar D., Danelisen I., Iliskovic N.. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem* 207 (2000) 77–86.
- Spanings-Pierrot C., Soye D., Van Herp F., Gompel M., Skaret G., Grousset E., Charmantier G.. Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gill ion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119 (2000) 340-350.
- Spees J. L., Chang S. A., Snyder M. J., Chang E. S.. Osmotic induction of stress-responsive gene expression in the lobster *Homarus americanus*. *Biol. Bull.* 203 (2002) 331-337.
- Storey J.M., Storey K.B. Oxygen limitation and metabolic rate depression. In: K.B. Storey, Editor, *Funct. Metab.: Regu. Adapt.* Wiley-Liss Hoboken (2004) 594 pp..
- Taylor P. M. (1985) The pattern of gill perfusion in two species of *Corophium* (Crustacea: Amphipoda) and its relation to environmental salinity. *J. Zoo.* 205 (1985) 29-38.
- Therien A.G., Blostein R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279 (2000) C541-C566.
- Tierney A.J., Kim T., Abrams R.. Dopamine in crayfish and other crustaceans: Distribution in the central nervous system and physiological functions. *Microsc. Res. Tech.* 60 (2003) 325-335.
- Towle D.W., Paulsen R.S., Weihrauch D., Kordylewski M., Salvador C., Lignot J.-H., Spanings-Pierrot C.. Na⁺⁺K⁺-ATPase in gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: cDNA sequencing and salinity related expression of α -subunit mRNA and protein. *J. Exp. Biol.* 204 (2001) 4005–4012.
- Towle D.W., Weihrauch D.. Osmoregulation by gills of euryhaline crabs: molecular analysis of transporters. *Am. Zool.* 41 (2001) 770–780.

- Tresguerres M., Onken H., Pérez A.F., Luquet C.M.. Electrophysiology of posterior, NaCl- absorbing gills of *Chasmagnathus granulatus*: rapid responses to osmotic variations. *J. Exp. Biol.* 206 (2003) 619–626.
- Tsutsui H., Ide T., Hayashidani S., Suematsu N., Utsumi H., Nakamura R., Egashira K., Takeshita A.. Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. *Cardiovasc. Res.* 49(1) (2001) 103-109.
- Turcato G.T.. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na lagoa de Tramandaí, RS, Brasil, Monografia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS (1990).
- Valle S. C., Eichler P., Maciel J. E., Machado G., Kucharski L.C., Da Silva R.S.M.. Seasonal variation in glucose and neutral amino acid uptake in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Phys. A* (3) (2009) 252-257.
- Vargas M.A., Geish M.A., Maciel F.E., Cruz B.P., Filgueira D.M.V.B., Ferreira G.J., Nery L.E.M., Allodi S.. Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Phys. C* 151(3) (2010) 343-50.
- Wanson S. A., Péqueux A., Roer R. D.. Na⁺ regulation and Na, K-ATPase activity in the auryhaline fiddler crab *Uca minax* (Le Conte). *Comp. Biochem. Physiol.* 79 (1984) 128-141.
- Weihrauch D., McNamara J.C., Towle D.W., Onken H.. Ion-motive ATPases and active, transbranchial NaCl uptake in the red freshwater crab, *Dilocarcinus pagei* (Decapoda, Trichodactylidae). *J. Exp. Biol.* 207 (2004) 4623–4631.
- Werner I.. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Mar. Envir. Res.* 58 (2004) 803-07.
- Wilhelm Filho D., Gonzalez-Flecha B., Boveris A. Gill Diffusion As A Physiological Mechanism For Hydrogen Peroxide Elimination In Fish. *Braz. J. Med. Biol. Res.* (Impresso) 27 (1994) 2879-2882.
- Yenari M.A., Giffard G.R.G., Sapolsky R.M., Steinberg G.K.. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol. Med. Today* 5 (1999) 525-31.
- Zhang Y., Huang L., Zhang J., Moskophidis D., Mivechi N. F.. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J. Cel. Biochem.* 86 (2002) 376-93.

ANEXOS



Felipe Amorim Fernandes <felfernandes@ig.com.br>

Submission Confirmation

1 mensagem

JEMBE <jembe@elsevier.com>

5 de dezembro de 2010 15:42

Para: felfernandes@ig.com.br

Dear Dr Felipe Amorim Fernandes,

Your submission entitled "Osmotic stress: oxidative balance, Na⁺/K⁺ATPase activity and heat shock proteins in anterior and posterior gills of the crab *Neohelice granulata*" has been received by Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author or you may contact the Editor directly. The URL is <http://ees.elsevier.com/jembe/>.

Your username is: felfernandes@ig.com.br

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/jembe/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Osmotic stress: oxidative balance, Na⁺/K⁺ATPase activity and heat shock proteins in anterior and posterior gills of the crab *Neohelice granulata*

Fernandes, F.A.^{1*}; Dutra, B.K.²; Mosele, F.³; Araujo, A.S.R.³; Ferreira G. D.⁴, Belló-Klein, A.³; Kucharski, L.C.R.¹; Da Silva, R.S.M.¹

1. Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia de Invertebrados e Vertebrados, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

2. Laboratório de Fisiologia da Conservação, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Zoologia, Brazil

3. Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

4. Laboratório de Endocrinologia e Tumoral Molecular Biologia, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS, Rua Sarmiento Leite, 500, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

M.Sc. Felipe Amorim Fernandes

Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500

90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Fax +55 51 33 08 3453

e-mail: felfernandes@ig.com.br

Abstract

This study determines the effect of *in vivo* hyperosmotic stress and hyposmotic on oxidative balance in *Neohelice granulata*. Experimental times were determined as 1 h and 6 h based on assessment of posterior and anterior gill dry weight. Significant differences were found in H₂O₂ concentration after exposure to both types of stress in both tissues. Lower H₂O₂ levels were observed after both exposure times, while glutathione levels decreased after 1-h stress in gills and after 6-h stress exposure in posterior and anterior gills submitted to the hyperosmotic stress, showing similar levels as the control group. The results indicate that the decrease in peroxide levels after 6 h of stress occurs due the increase in glutathione levels and that the cause of the decrease in peroxide levels after 1 h seems to be related with the decrease in Na⁺/K⁺ATPase activity and, consequently, in metabolism. The animals showed an interesting strategy to minimize the damage caused by both hyposmotic and by hyperosmotic shock. Metabolism in these crabs seems to decrease within 1 h of stress.

Keywords: Hyperosmotic stress, Hyposmotic stress, Gills, Antioxidant system

Introduction

According to the literature, the anterior gills of euryhaline crabs are in charge of gas exchange, while the posterior gills perform adjustments required for osmoregulation, among other functions (Gilles and Delpire, 1997; Siebers et al., 1983; Genovese et al., 2000; Luquet et al., 2002). In the environment, anterior and posterior gills are both in direct contact with water of varying salinity levels inside the branchial chambers. In *Eriocheir sinensis* and *Carcinus maenas* acclimated to seawater dilutions, the gills showed a significant increase in oxygen consumption and in the activity of cytochrome C oxidase (Welcomme and Devos 1988).

Oxidative stress occurs when antioxidant defenses are overcome by pro-oxidant forces. As a result, some oxidative damage may appear like lipid peroxidation, DNA strand breaks and covalent binding to protein and nucleic acid, for example (Zhang et al., 2004; Hermes-Lima et al., 2001; Ferreira et al., 2003). Alterations in abiotic environmental factors like temperature, salinity and dissolved oxygen may cause oxidative stress, leading to the generation of reactive oxygen stress and alterations in antioxidant or free oxygen radicals scavenging enzyme systems in aquatic organisms (Livingstone, 2001, 2003).

According to Belli et al. (2009), several studies have found a close link between hyper-regulation and Na^+K^+ -ATPase activity in gills, which decreases when crustaceans are acclimated to different salinities (Péqueux, 1995; Lucu and Towle, 2003; Leone et al., 2005; Freire et al., 2008). Kirschner (2004) and Belli et al. (2009) described a central role for the gill Na^+K^+ ATPase as an apical Na^+/H^+ exchanger and a $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ co-transporter that apparently mediates Na^+ flux into the gill cells of weak hyper-regulators, while an apical V-H^+ ATPase and Na^+ channels may prevail in strong hyper-regulators. The basally located Na^+K^+ ATPase then exports 3Na^+ from cytosol to the hemolymph, concomitantly

importing $2K^+$ at the expense of ATP hydrolysis.

The environmental variations in salinity require metabolic adjustments in organisms in order to control the transference of water and ions between the individuals and their medium (Kirschner, 1991; 2004; Pinoni and Mañanes, 2009). The study of the role of heat shock proteins (Hsps) in stress physiology has shown that all species have the genes coding for Hsps, although the expression pattern of these genes varies with the stress level of the environment, and the expression of Hsp, especially Hsp 70, has been used as a marker of stress (Yenary et al., 1999). It has been hypothesized that species with higher expression of stress proteins are subject, as could be expected, to more variable environmental conditions, which may make them more resistant to stress (Feder and Hofmann, 1999). Thus, estuarine animals or animals that spend part of their life cycle in estuaries could be more resistant due to higher levels of expression of stress proteins. Moreover, the ability to increase cellular levels of Hsp70 in response to heat shock was impaired in shellfish collected in areas of low salinity (Werner, 2004). Thus, if Hsp70 is to be used as an indicator of stress, more knowledge about the influence of natural environmental factors like temperature and salinity on the expression of this protein is required.

According to Gilles and Delpire (1997), euryhaline crustaceans utilize two basic mechanisms to deal with osmotic stress: (a) anisosmotic regulation of the extracellular fluid, which controls the osmolality of the hemolymph independently of the osmolality of the external medium; and (b) isosmotic regulation of the intracellular fluid, with two stages of control of cell volume. The first stage is responsible for the immediate responses that occur as a consequence of cell-volume changes caused by osmotic shock, and involves the plasticity of the plasma membrane. The second stage is related to the events of influx and efflux of the osmotic effectors, either organic or inorganic (Gilles and Delpire, 1997). In

crustaceans, free amino acids are considered important osmotic (organic) effectors; additionally, in some euryhaline species intracellular concentration of these free amino acids is 10 times higher than that observed in mammals (Gilles and Delpire, 1997).

Neohelice granulata Dana, 1851, is a euryhaline crab that inhabits the mid- and supralittoral zones of estuaries along the southern Brazilian coast. The species presents hypo-osmotic hemolymph when exposed to concentrated media, and hyperosmotic hemolymph in diluted media, with an isosmotic point in external media between 28.5 and 30‰ in winter and summer, respectively (Bianchini et al., 2008). In its habitat, this crab is exposed to a large number of environmental challenges such as changes in temperature, photoperiodicity, environmental oxygen partial pressure, food availability and composition, and salinity according to each season of the year. Therefore, our study was designed to address the following question: would antioxidant defenses as well as the reduction in metabolic activity and the recruitment of hsp 70 and 90 the strategies *N. granulata* uses to respond to variation in salinity in the medium and that allow the species to inhabit estuaries?

Materials and methods

Animals

Male *N. granulata* crabs weighing from 14 to 17 g in stage C of the intermolt cycle as defined by the morphological criteria described by Drach and Tchernigovtzeff (1967), were collected in Lagoa Tramandaí, a lagoon in the state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Experimental procedure

Crabs were maintained in a large tank containing fresh running water at a salinity of 20x, temperature of 25°C, and natural photoperiod for 15 days before being used in the experiments. The animals were fed raw meat *ad libitum* once a day (50 g per 25 crabs) in late afternoon. After the acclimation period, 15 crabs were maintained in a 20x salinity medium (control group). The other animals (30 crabs in each experimental group) were transferred to aquaria with salinity of 34x or 0x (distilled water), where they remained for 1 h and 6 h. The hemolymph osmolality in control and after 1 h hypo- or hyperosmotic stress were 631, 569 and 590 mOsm/kg, respectively. The hemolymph osmolality of the crabs that remained for 6 h under hypo- or hyperosmotic stress were 657 and 743 mOsm/kg, respectively. The anterior and posterior gills were obtained from crabs anesthetized by chilling on ice for 5 min, whereupon tissues were immediately removed for analysis.

Preparation of homogenates for protein and catalase

Homogenization was conducted in high-performance disperser (Ultra-Turrax T25 Basic, Ika Labortechnik) with phosphate buffer (KCl 140 mM, phosphate 20 mM, pH 7.4) (9 mL/g of tissue) for 40 s in ice. The homogenates were centrifuged for 10 min at 3000 rpm (Sorvall 5B-Rotor SM 24, Du Pont Instruments, EUA) at 4 °C. The supernatants were removed and stored at -80°C upon use in enzyme assays (Llesuy et al., 1985).

Protein measurements

The protein concentration was measured according to the method developed by Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (1 mg/mL) as standard. The results were expressed as mg/mL.

Catalase activity

Catalase (CAT) activity was determined by measuring the exponential disappearance of H_2O_2 at 240 nm, and was expressed as pmoles per milligram of protein (Boveris and Chance, 1973).

Determination of oxidized and reduced glutathione concentration

To determine oxidized and reduced glutathione concentration, tissue was deproteinized with 2 mol/L perchloric acid and centrifuged for 10 min at $1000 \times g$. The supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide. The reaction medium contained 100 mmol/L phosphate buffer (pH 7.2), 2 mmol/L nicotinamide dinucleotide phosphate acid, 0.2 U/mL glutathione reductase, 70 $\mu\text{mol/L}$ 5,5' dithiobis (2-nitrobenzoic acid). To determine reduced glutathione, the supernatant was neutralized with 2 mol/L potassium hydroxide, to react with 70 $\mu\text{mol/L}$ 5,5' dithiobis (2-nitro benzoic acid), and read at 420 nm (Akerboom and Sies, 1981).

Hydrogen peroxide formation

The method used is based on oxidation of phenol red by H_2O_2 mediated by horseradish peroxidase, resulting in a product that absorbs at 610 nm. The branchial tissues were incubated for 60 min in 10 mM phosphate buffer (NaCl 140 mmol/L and dextrose 5 mmol/L). The supernatant was collected and added to the buffer solution red phenol 0.28 mmol/L and horseradish peroxidase 8.5 U/mL. After a 10-min interval, NaOH 1 mol/L was added and the measurement performed at 610 nm. The results were expressed as nmol of H_2O_2 per mg protein (Pick and Keisari, 1980).

To determine the amount of H_2O_2 in water, five animals were placed in each aquarium per experimental group as a 1 animal: 1L of distilled water ratio in tanks with constant aeration, temperature of $25\pm 1^\circ\text{C}$ and natural photoperiod. Exposure times of the control group and two groups exposed to hypo-osmotic or hyperosmotic stress were the same as described above. At the end of each experimental period samples were taken to quantify the levels of hydrogen peroxide. The results were expressed as nmol of H_2O_2 per mL of water.

Na^+/K^+ ATPase activity

The membrane was extracted from each tissue, according to Barnes et al. (1993). The tissue was homogenized (10% W/V) in cold Tris buffer (40 mM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM; Sigma, St. Louis, MO, USA) with pH adjusted to 7.40. The homogenate was centrifuged at 10,000 g at 4°C , and the supernatant was collected and centrifuged at 40,000 g (4°C). The pellet was resuspended in the same buffer and centrifuged again at 40,000 g (4°C). This last supernatant was then used as the source of Na^+/K^+ ATPase. Na^+/K^+ ATPase activity was measured according to the method described by Dutra et al. (2008). Incubation medium A contained ATP (5 mM; from Sigma), NaCl (60 mM), KCl (10 mM) and MgCl (40 mM), with pH adjusted to 7.40. In the incubation medium B, KCl was replaced by ouabain (1 mM; Sigma). Aliquots of homogenate were incubated at 30°C in media A and B, for 30 min, with 10 mg of protein. The enzyme reaction was stopped by adding 10% trichloroacetic acid. The inorganic phosphorus released was determined in a spectrophotometer at 630 nm using the method of Chan and Swaminathan (1986). Any difference in phosphorus concentration between

medium A and B was attributed to Na^+/K^+ ATPase activity. All determinations were made at least in quadruplicate. Results are expressed in μmol of the P_i . mg protein $^{-1}$. min^{-1} .

Extraction and Quantification of Proteins for Western Blot

For protein extraction, both tissues (300 mg) were homogenized with OmniMixer ® for 30 s with a lysis buffer (Tris (10 mM), EDTA (100 mM), PMSF (200 mM), NaF (200 mM), $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (10 mM) Na_3VO_4 (2 mM) and Triton X-100 (10%)) with pH adjusted to 7.40, then the material was centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a new tube, and an aliquot of approximately 15 μL was used for the measurement of total protein (in triplicate) according to the colorimetric method developed by Bradford (1976). After this measurement, the material was stored at -20° C for subsequent analysis of protein expression by Western blot.

Western blot analysis of Hsp 70 and 90

For separation of proteins, we used SDS-PAGE (polyacrylamide in gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate) with a concentration of 10% polyacrylamide. Approximately 50 μg of protein extracted from the samples was incubated with Laemmli solution (glycerol (50%), SDS (10%), Tris (65 mM), bromophenol blue (0.1%) and 2- β -mercaptoethanol (0.05 %)) at 95°C for 3 min (Laemmli, 1970), and added to each well of the gel. Electrophoresis was performed in a medium containing buffer prepared with glycine (192 mM), Tris (25 mM) and SDS (0.1%) at pH 8.3. The proteins migrated along the gel at 120 V for approximately 3 h and 30 min. The race of the proteins was monitored by bromophenol blue present in the sample buffer. The equipment used was a mini-PROTEAN ® 3 Cell Electrophoresis (BioRad, USA). After electrophoresis, polyacrylamide

gels were removed from the glass plates and placed in the electrotransference module in contact with nitrocellulose (NC) covered with transfer buffer (glycine (192 mM), Tris (25mM) SDS (0.1%) and methanol (20%) at pH 8.3). The transfer was performed in the Trans-Blot SD system - Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BioRad, USA) for 1 h at an operating voltage of 25 V.

NC membranes containing the proteins were then incubated for 1 h in blocking solution containing NaCl (150 mM), Tris (50 mM), Tween 20 (0.05%), pH 7.4, plus milk powder (5 %). This solution saturates nonspecific binding sites on NC membrane.

After blocking, NC membranes were incubated for 16 h at 4°C under constant stirring, with specific antibodies diluted in TTBS (catalog number H5147: Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 antibody produced in mouse - clone BRM- 22, ascites fluid (Sigma Aldrich) and catalog number H1775: Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 90 antibody produced in mouse - clone AC-16, ascites fluid (Sigma Aldrich)). After incubation, the membranes were washed with TTBS (1%) (3 10-min washes) and then incubated with second antibody (catalog number A9044: Anti-Mouse IgG (whole molecule) - peroxidase antibody produced in rabbit - IgG fraction of antiserum, buffered aqueous solution (Sigma Aldrich)) powder for 2 h at room temperature. After this, the membranes were washed with TBS (three 10-min washes). Finally, the membranes were incubated with chemiluminescence solution for 1 min in a darkroom. The reaction was performed in a chemiluminescence detection system based on luminescence substrates (luminol and p-coumaric acid).

After incubation with the solution chemiluminescence, NC membranes were placed in contact with photographic film (GE Healthcare ® / Hypperfilm™ Amersham ECL), from 10 s to 3 min. After revelation, the film was analyzed by optical densitometry

of the bands, measured by an image processing (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, USA). The optical density obtained for the bands of Hsp70 and Hsp90 were corrected by protein densitometry of the strongest band (at the time of 70 kD) in the membranes of NC, which were stained with Ponceau (Technical Comassie blue), with results being expressed as arbitrary units (AU).

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard error. All the metabolic parameters were homogeneous (Levene test), and were normally distributed (Kolmogorov–Smirnov test). For statistical analysis of the different treatments, a one-way ANOVA test was used, followed by a Bonferroni test. For comparisons between different osmotic stress and times, a two-way ANOVA was used. The significance level adopted was 5%. All the tests were conducted in the program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 11.5) for Windows.

Results

The levels of H₂O₂ formed in the anterior gills of crabs exposed to hyposmotic or hyperosmotic stress for 1 h were similar to the levels observed in the control. However, in anterior gills from animals exposed to both stress for 6 h the H₂O₂ levels were lower ($p < 0.05$) than those of control (Fig. 1).

H₂O₂ levels formed in the posterior gills of *N. granulata* exposed to hyposmotic stress for 1 h or 6 h were two times lower ($p < 0.05$) than those of control. In posterior gills of animals exposed to 1 and 6 h hyperosmotic stress the H₂O₂ levels were three and two times, respectively, lower ($p < 0.05$) than those of the control (Fig.2).

H₂O₂ levels quantified in water after 1 or 6 h of hyposmotic stress and 1 h of hyperosmotic stress was lower ($p<0.05$) than in the control. After 6 h of hyperosmotic stress, the H₂O₂ levels were twice as high ($p<0.05$) as those of the control group (Fig 3).

The levels of catalase activity in the anterior gills of crabs exposed to hypo-osmotic stress for 1 h were as high ($p<0.05$) as in the control, while in those gills exposed to 6 h of stress H₂O₂ levels were three times ($p<0.05$) higher. In turn, in the anterior gills of animals exposed to 1-h hyperosmotic stress the levels of catalase activity were two times ($p<0.05$) higher than in the control, while in animals exposed to 6 h of stress values were five ($p<0.05$) times higher than in the control. The levels of catalase activity were 1.8 times lower after exposure for 1 h in comparison to exposure for 6 h (Fig. 4).

The levels of catalase activity in posterior gills of *N. granulata* exposed to hyposmotic stress for 1 h were similar to those of control, while in the gills of animals those exposed to 6 h of stress catalase levels were three ($p<0.05$) times higher; the same pattern was found in the posterior gills of animals exposed to hyperosmotic stress. The levels of catalase activity were 2.5 times higher in gills exposed to 1-h stress as compared to the gills exposed to 6-h stress (Fig. 5).

The oxidized:reduced glutathione ratio in the anterior gills of crabs exposed to hyposmotic stress for 1 h were 18 times ($p<0.05$) smaller than those of the control, while in the gills exposed to 6 h of stress ratios were 13 times ($p<0.05$) higher. The oxidized:reduced glutathione ratio in anterior gills exposed to hypo-osmotic stress for 1-h was 123 times ($p<0.05$) lower than in gills exposed to 6-h stress. In turn, in the anterior gills of animals exposed to 1-h hyperosmotic stress the ratio of oxidized to reduced glutathione was 17 times ($p<0.05$) lower than in the control, while in animals exposed to 6 h of stress concentrations were similar to those of control. The oxidized:reduced

glutathione ratio was 17 times higher in samples exposed to 1-h stress as compared to those exposed to 6-h stress. There were significant differences between the two stresses (Fig. 6).

The oxidized:reduced glutathione ratio in the posterior gills of crabs exposed to hyposmotic stress for 1 h was 10 ($p<0.05$) times smaller than those of the control, while in posterior gills exposed to 6 h of stress the ratios were 3.6 ($p<0.05$) times greater.

The oxidized:reduced glutathione ratio measured in posterior gills from crabs exposed to hyperosmotic stress for 1-h was 29 times ($p<0.05$) lower than in samples exposed to 6-h stress. In turn, in the gills from animals exposed to 1-h hyperosmotic stress, oxidized:reduced glutathione ratio was 16 times lower than that of the control, while in animals exposed to 6 h of stress concentrations were similar to those of control. Significant differences were observed between hypo- and hyperosmotic stress (Fig. 7).

The levels of Na^+/K^+ ATPase activity in the anterior gills of crabs exposed to hypo-osmotic stress for 1 h or 6 h were 2.5 ($p<0.05$) times lower than those of the control. In the anterior gills of animals exposed to 1-h hyperosmotic stress, the Na^+/K^+ ATPase activity was 2 times ($p<0.05$) lower than in the control. Similarly, in the animals exposed to 6 h of hyperosmotic stress a decrease of 30% ($p<0.05$) in Na^+/K^+ ATPase activity was observed in relation to the control. The levels of enzyme activity observed after 6-h stress exposure were the twice as high as the activity found in specimens exposed to stress for 1 h. Significant differences were observed between the two kinds of stress (Fig. 8).

Comparing the Na^+/K^+ ATPase activity between the anterior and posterior gills in control group the enzyme activity was significant higher in posterior gills (Fig. 8 and 9).

Na^+/K^+ ATPase activity in posterior gills of *N. granulata* exposed to hyposmotic stress for 1 h and 6 h were 4 and 3 ($p<0.05$) times lower than those of the control, respectively. The same pattern was observed in the posterior gills of animals exposed to

hyperosmotic stress. No significant difference was observed between the two kinds of stress (Fig. 9).

The amount of Hsp70 or Hsp 90 formed in the anterior gills of crabs exposed to hyposmotic or hyperosmotic stress for 6 h was similar to those quantified in the control group (Fig. 10). The concentration of Hsps 70 and 90 was similar in anterior gills.

In the posterior gills the levels of Hsp 70 were significantly higher after exposure to hypo-osmotic stress, when compared with the control group. As for posterior gills exposed to hyperosmotic stress, there was no such difference in Hsp 70 levels. Hsp 90 levels quantified in posterior gills did not differ between the groups that underwent osmotic stress and control group (Fig. 11).

Discussion

The present study shows that in the first hour of exposure to hyposmotic or hyperosmotic stress the production of H_2O_2 remains constant in anterior gills of *N. granulata*. However, H_2O_2 levels go through a marked decrease after 6-h exposure to osmotic stress. In posterior gills, H_2O_2 levels decreased already in the first hour of exposure to osmotic stress and remained low upon the end of the experimental period. The decrease in oxidized:reduced glutathione ratio in anterior and posterior gills after 1-h exposure to osmotic stress suggest the occurrence of oxidative stress in these tissues. The increase in CAT activity and probably in reductase glutathione in anterior and posterior gills throughout the exposure to osmotic stress could explain the drop in H_2O_2 levels and the increase in the oxidized:reduced glutathione ratio observed after 6-h exposure to stress. This increase in oxidized:reduced glutathione ratio reflects the termination of the peroxidation process observed at the end of the experimental period. Oppositely, a decrease

in CAT activity was observed in the gills of the crab *S. serrata* in a study that analyzed anterior and posterior gills without distinction, when animals were acclimated to 35 ppt salinity for 21 days (Paital and Chainy, 2010). However, the authors observed a marked increase in glutathione reductase activity in that crab (Paital and Chainy, 2010).

In *N. granulata*, the anterior gills are equipped with respiratory epithelium and do not undergo significant structural changes when faced with variations in salinity in the medium (Luquet et al., 2002; Genovese et al., 2004; Freire et al., 2008). Studies have demonstrated that *N. granulata* increases oxygen consumption in response to the metabolic adjustments required during acclimation to different salinity levels (Bianchini et al., 2008). Therefore, the metabolic activity of this tissue would increase concomitantly with the greater need for oxygen transport, though these results were observed for *N. granulata* exposed to long osmotic stress periods (24 – 168 h) (Bianchini et al., 2008). The three pairs of posterior gills exhibited osmoregulatory activity and, depending on the salinity in the medium in which the animal lives, the NaCl transport process may be promoted (if in a hyposmotic medium) or inhibited (if in an hyperosmotic medium) (Castilhos et al., 2001; Bianchini et al., 2008; Freire et al., 2008). The literature reports that Na⁺/K⁺ATPase activity increases in anterior and posterior gills of *N. granulata* acclimated to low salinity for long periods (Castilho et al., 2001; Freire et al., 2008). However, when these crabs were exposed to hyperosmotic stress for long periods, Na⁺/K⁺ATPase activity decreased significantly (Castilho *et al.*, 2001; Bianchini et al., 2008).

In a study on *N. granulata* exposed to anoxia for 8 h, a significant increase in CAT and glutathione-S-transferase (GST) has been observed (De Oliveira et al., 2005). The authors suggest that the increased activity of these enzymes during anoxia is part of a strategy to prepare the animal to face oxidative stress so as to protect the tissues from a

likely damage during the reoxygenation period in post-anoxia recovery (De Oliveira et al., 2005). Similarly, an increase in CAT activity was also observed in gills of *Paralomis granulosa* after 3 and 6 h of exposure to atmospheric air (Romero et al., 2007). The same preparatory mechanism for the oxidative stress was observed in inland snails (Hermes-Lima et al., 1998; Ramos-Vasconcelos et al., 2005). In the present study, a similar situation apparently takes place during anoxia in anterior and posterior gills of *N. granulata* after short periods of exposure to osmotic stress. In these tissues, the activity of the Na⁺/K⁺ATPase pump is markedly reduced when the crabs were exposed to 1- or 6-h hyposmotic or hyperosmotic stress. In invertebrates, it has been proved that the decrease in Na⁺/K⁺ATPase pump activity is a strategy adopted to reduce the expenditure of ATP (Nilsson, 2001). Nevertheless, since Na⁺/K⁺ATPase in the basal membrane is considered as a source of energy in the process of Na⁺ transport in the apical membrane, other transporters may also be important in terms of controlling ion transportation during short periods, as suggested by Lucu and Towle (2003). Therefore, the reduced pace of processes that consume energy, the increase in antioxidant defenses mediated by CAT, and the recycling of oxidized glutathione into reduced glutathione via glutathione reductase (which increases the oxidized:reduced glutathione ratio) afforded the tissues of anterior and posterior gills to utilize metabolic strategies to mobilize energy sources during the acclimation to osmotic stress, towards the end of exposure times. These strategies include the mobilization of lipids as a source of energy to be used in the osmoregulatory efforts made by *N. granulata* (Luvizotto-Santos et al., 2003; Chittó et al., 2009). Several studies on *N. granulata* have shown the impact caused by osmotic stress on expression and activity of important enzymes involved in intermediary metabolism during long acclimation periods (between 24 and 144 h), in media with different salinity levels (Schein et al., 2004; Schein

et al., 2005; Martins et al., 2010).

In spite of the functional and structural difference between posterior and anterior gills, no statistically significant differences were observed in production of H_2O_2 , in CAT activity or in the oxidized:reduced glutathione ratio between the tissues collected from crabs exposed to the same experimental conditions (controls). H_2O_2 levels in gills were 10 and 6 times smaller than the values observed for hepatopancreas and muscle, respectively. This finding suggests that gills have a more efficient antioxidant system in comparison to the other tissues studied.

The dosage of hydrogen peroxide into water from aquariums in the control group and after 1 and 6 hours of hyper-or hyposmotic stress, demonstrated the ability of the *N. granulata* to eliminate this compound into the water. In fish, hydrogen peroxide, as a molecule that spreads easily, can be eliminated by diffusion through the gills (Wilhelm-Filho et al., 1994). After an hour of osmotic stress there is a marked decrease in the values of hydrogen peroxide into water aquariums in both groups coinciding with the reduction of hydrogen peroxide found in the posterior gills. However, within 6 hours of hyperosmotic stress there has been a marked increase of hydrogen peroxide in the aquarium water of animals subjected to hyperosmotic stress, explaining the low levels of this compound in the gills.

Maciel et al. (2004) demonstrated a daily variation in antioxidant defenses and lipoperoxidation in *N. granulata* gills. In the present study the experiments were always conducted at the same time, to minimize the influence of this aspect.

Levels of Hsp 70 and 90 were similar in anterior gills of control animals. In turn, Hsp 90 levels were significantly higher than Hsp 70 levels in posterior gills of the control group. As a rule, baseline Hsp 90 values are higher than Hsp 70 values in tissues (Kiang

and Tsokos, 1998). Evidence shows that Hsps also protect cells, tissues and organs against hypoxia and ischemia-reperfusion. Although *N. granulata* respiratory system does not stand aerial respiration (Santos et al., 1987), this crab species is able to survive long periods out of water and is therefore typically considered a semi-terrestrial organism (Mañe-Gazon et al., 1974). During these terrestrial excursions, *N. granulata* reduces oxygen consumption, increases circulating lactate levels and slows down mobility, which characterizes a state of hypoxia (Santos et al., 1987; Maciel et al., 2008). Higher Hsp 70 levels in anterior gills would therefore be part of a strategy to protect cells from changes in O₂ concentrations in the environment. During hyposmotic as well as hyperosmotic stress, levels of Hsp 70 and 90 did not vary in anterior gills. This response could partly explain the hypothesis put forward by Feder and Hofmann (1999), which assumes that high Hsp 70 levels make the cell more resistant to stress. Genetically modified rats, which overexpress Hsp 70, are more resistant to the adverse effects of ischemia or heat (Kiang and Tsokos, 1998).

Oppositely, hyposmotic shock induces an increase of 47% in Hsp 70 levels in posterior gills of *N. granulata*. Frenkel et al. (2008) demonstrated a significant increase in Hsp 70 levels in the nervous system of *N. granulata* after exposure to heat and no access to water.

The increase in Hsps expression is a good marker of changes in cell metabolism. This result lends more robustness to the hypothesis that the decrease in activity of Na⁺/K⁺ATPase pump is responsible for oxidative stress and for a reduction in ATP consumption in that tissue, during the first acclimation hour. Thus, the increase in Hsp 70 levels could be seen as one of the cell protection mechanisms against oxidative stress caused by osmotic stress in an organ that is extensively exposed to the outer medium and that as a consequence is subject to changes in salinity levels. Several papers have

demonstrated the physiological and ecological importance of Hsp 70 and 90 expression in response to changes in the environment (Feder and Hofmann, 1999).

The results obtained in the present study afford to conclude that *N. granulata* presents coordinated antioxidant responses as a defense strategy to minimize or avoid damage caused by osmotic stress during the initial period of acclimation to changes in salinity levels. Also, it was possible to observe that the animal antioxidant system may be modulated during exposure to oxidative stress, though this modulation ability is tissue-specific and not uniform for the whole organism. Yet another strategy *N. granulata* adopts against osmotic stress is the decrease in Na⁺/K⁺ATPase pump activity, which reduces ATP consumption. Hsp was shown to increase only in posterior gills, confirming the findings by Chang (2005), who observed that tissues do not respond equally to a determined kind of stress. As far as osmotic stress is concerned, posterior gills are in charge of offering a protective response, since these are the main regulator organ in crustaceans.

Acknowledgments

This work was supported by grants from, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brazil. R.S.M.S. and L.C.K. are a CNPq fellow. The authors wish to thank Dr. Llesuy S for the suggestions.

References

- Akerbon, T.P.M., Sies H., 1981. Assay of glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Meth. Enz.* 77, 373-382.
- Barnes H., Blackstock J., 1993. Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphophosphanillin method for total lipids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 12, 103–118.
- Belli, N.M., Faleiros, R.O., Firmino, K.C.S., Masui, D.C., Leone, F.A., McNamara, J.C., Furriel, R.P.M., 2009. Na,K-ATPase activity and epithelial interfaces in gills of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 152A, 431–439.
- Bianchini, A., Lauer, M. M., Nery, L. E. M., Colares, E. P., Monserrat, J. M., Santos, E. A. F., 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 151, 423–436.
- Boveris, A., Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707-716.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Castilho, P.C., Martins, I.A., Bianchini, A, 2001. Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256, 215–227.
- Chan, L.P., Swaminathan, R., 1986. Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.

- Chang, E. S., 2005. Stressed-Out Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins Integral. *Integr. Comp. Biol.*, 45:43–50 (2005) 45 (2005) 43–50.
- Chittó, A.L.F., Schein, V., Etges, R., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2009. Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. *Inv. Biol.*, 128.
- De Oliveira, U. O., Araújo, A. S. R., Bello´-Klein, A., Da Silva, R. S. M., Kucharski L. C., 2005. Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140 B, 51–57.
- Drach, F., Tchevnigontzeff, C., 1967. Sur la méthode de détermination des stages d'intermue et son application générale aux crustacés, *Vie Milieu* 18, 595–607.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E., 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Ferreira, M.V.R., Alencastro, A.C.R., Hermes-Lima, M., 2003. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can. J. Zool.* 81, 1239-1248.
- Freire, C. A., Horst, O., McNamara, J.C., 2008. A structure-function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 272–304.
- Frenkel, L., Dimant, B., Portiansky, E.L., Maldonado, H., Delorenzi, A., 2008. Both heat shock and water deprivation trigger Hsp70 expression in the olfactory lobe of the crab *Chasmagnathus granulatus* *Neurosc. Let.* 443, 251–256.
- Genovese, G., Luchetti, C. G., Luquet, C. M. 2004. Na⁺/K⁺-ATPase activity and gill ultrastructure in the hyper-hypo-regulating crab *Chasmagnathus granulatus* acclimated to dilute, normal, and concentrated seawater. *Mar. Biol.* 144, 111–118.

- Genovese, G., Luquet, C.M., Paz, D.A., Rosa, G.A., Pellerano, G.N., 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. *J. Anat.* 197, 239–246.
- Gilles, R., Pequeux, A., 1985. Ion transport in crustacean gills: Physiological and ultrastructural approaches. In: Gilles R, Gilles-Baillien M (eds) *Transport process, iono- and osmoregulation*. Springer, Berlin Heidelberg, pp 136–158
- Gilles, R., Delpire, E., 1997. Variations in salinity, osmolarity, and water availability: vertebrates and invertebrates. In: W.H. Dantzler, Editor, *Handbook of Comparative Physiology 2*, Oxford University Press, New York pp 1523–1586.
- Hermes-lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B.. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. (Review Article). *Comp. Biochem. Physiol.* 120 B (1998) 437-448.
- Hermes-lima, M., Gonçalves, M.S., RG, A.J.. Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) prevents copper-mediated free radical formation. *Mol. Cell. Biochem.* 228 (2001) 73-82.
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C., 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80, 183-201.
- Kirschner, L.B., 1991. Water and Ions. In: Prosser CL (Ed) *Environmental and Metabolic Animal Physiology*. *Comp. Animal Physiol.* Wiley-Liss, New York.
- Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals, *J. Exp. Biol.* 207. 1439–1452.
- Laemmli, E.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227, 680–685.

- Leone, F.A., Baranauskas, J.A., Furriel R.P.M., Borin, I.A., Sigraf, W., 2005. An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data, *Biochem. Mol. Biol.* 33, 399–403
- Livingstone, D.M., 2003. Impact of secular climate change on the thermal structure of a large temperate central European lake. *Clim. Change* 57, 205–225.
- Livingstone, D.R., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 656-666.
- Llesuy, S.F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., Milei, S., 1985. Comparison of lipid peroxidation and Myocardia Damage Induced by Adriamycin and 4'-Epiadrimicin in Mice. *Tumor.* 71, 241-249.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Lucu, C., Towle, D.W., 2003. Na⁺,K⁺-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comp. Biochem. Physiol. A* 135, 195–214.
- Luquet, C.M., Postel, U., Halperin, J., Urcola, M.R., Marques, R., Siebers, D., 2002. Transepithelial potential differences and Na⁺ flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. *J. Exp. Biol.* 205, 71–77.
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J.T., Branco, Z.P., Bianchini, A., Nery, L.E.M., 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool.* 295 A, 200–2005.
- Maciel, F.E., Rosa, C.E., Santos, E.A., Monserrat, J.M., Nery, L.E.M., 2004. Daily variations in oxygen consumption, antioxidant defenses, and lipid peroxidation in the gills and hepatopancreas of an estuarine crab. *Can. J. Zool.* 82, 1871–1877.

- Maciel, J.E.S., Souza, F., Valle, S., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2008. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* during hypoxia and post-hypoxia recovery. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 61-65.
- Mañe-Garzon, F., Dei-Cas, E., Hollman-Spector, B., Leymonie, J., 1974. Estudios sobre la biologia del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. I. Osmorregulacion frente a cambios de salinidad. *Physis*, Séc 33, 163–171.
- Martins, T. L., Chittó, A.L., Rossetti, C., Brondani, C., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2010. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A* In press.
- Nilsson, G.E., 2001. Surviving anoxia with the brain turned on. *News Physiol. Sci.* 16, 218–221.
- Paital, B., Chainy, G.B.N., 2010.. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity *Comp. Biochem. Physiol. C* 151, 142-151.
- Péqueux, A., 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crust. Biol.* 15, 1–60.
- Pick, E., Kotkes, P., 1980. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 38, 161-170.
- Pinoni, S.A., Goldemberg, A.L., López Mañanes, A.A., 2005. Alkaline phosphatase activities in muscle of the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus*: response to environmental salinity, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 326, 217–226.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M., 2005. Seasonal modulation of the free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140C, 165-174.

- Romero, M.C., Ansaldo, M., Lovrich, G.A., 2007. Effect of aerial exposure on the antioxidant status in the subantarctic stone crab *Paralomis granulosa* (Decapoda: Anomura). *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 54–59.
- Santos, E.A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A* 88, 21–25.
- Schein, V., Chittó, A.L.F., Etges, R., Kuscharski, L.C., Van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S.M., 2005. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* seasonal differences. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 316, 203–212.
- Schein, V., Wache, Y., Etges, R., Kucharski, L.C., Van Wormhoudt, A., Da Silva, R.S.M., 2004. Effect of hyperosmotic on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. *FEBS Letter* 561, 202–206.
- Siebers, D., Winkler, A., Leweck, K., Madian, A., 1983. Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Helgol. Meeresunters.* 36, 303–312.
- Welcomme, L., Devos, P., 1988. Cytochrome c oxidase and Na⁺–K⁺-ATPase activities in the anterior and posterior gills of the shore crab *Carcinus maenas* L. after adaptation to various salinities, *Comp. Biochem. Physiol. B* 89, 339–341.
- Werner, I., 2004. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Mar. Envir. Res.* 58, 803–807.
- Wilhelm, Filho D., Gonzalez-Flecha, B., Boveris, A. 1994. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination in fish. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 27, 2879–2882.

Yenari, M.A., Giffard, G.R.G., Sapolsky, R.M., Steinberg, G.K., 1999. The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70). *Mol. Med. Today* 5, 525-531.

Zhang, Y., Huang, L., Zhang, J., Moskophidis, D., Mivechi, N. F., 2002. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J. Cel. Biochem.* 86, 376-93.

Figure captions:

Figure 1: H₂O₂ levels formed in anterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. *p<0.05 significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 2: H₂O₂ levels formed in posterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. *p<0.05 significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 3: H₂O₂ levels in aquarium water of control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. *p<0.05 significant difference in relation of control group. a p<0.05 significant difference in relation of 1 hour stress (n=3). The test used was Student t test.

Figure 4: Catalase activity in anterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. *p<0.05 significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 5: Catalase activity in posterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. *p<0.05 significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 6: Ratio of Oxidized and Reduced Glutathione in anterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. *p<0.05 significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 7: Ratio of Oxidized and Reduced Glutathione in posterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. * $p < 0.05$ significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 8: Na^+/K^+ ATPase activity in anterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. * $p < 0.05$ significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 9: Na^+/K^+ ATPase activity in posterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 1 or 6 hours. * $p < 0.05$ significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was ANOVA one-way between experimental times and ANOVA two-way for comparing stress type, following by Tukey post-hoc.

Figure 10: Hsps 70 and 90 expression in anterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 6 hours (A – film with representative bands of Hsp 70 expression and ponceau of the same groups: control (c), hyposmotic (ho) or hyperosmotic (he). B - Graphic representation) (n=3). * $p < 0.05$ significant difference in relation of control group (n=3-5). The test used was Student t test.

Figure 11: Hsps 70 and 90 expression in posterior gills of *Neohelice granulata* in control group and hyposmotic (A) or hyperosmotic (B) stress by 6 hours (A – film with representative bands of Hsp 70 expression and ponceau of the same groups: control (c), hyposmotic (ho) or hyperosmotic (he). B - Graphic representation) (n=3). * $p < 0.05$ significant difference in relation of control group. a $p < 0,05$ significant difference in relation to Hsp 70. The test used was Student t test.

