

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

**COMISSÃO DE GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA E DAS RESERVAS DE GLICOGÊNIO E DE
FOSFAGÊNIO EM TECIDOS DE CARANGUEJOS *Neohelice granulata*
ALIMENTADOS COM UMA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS OU PROTEÍNAS E
SUBMETIDOS À ANOXIA E À FASE DE RECUPERAÇÃO DA ANOXIA**

CAMILA LÜDKE ROSSETTI

Porto Alegre

2010

CAMILA LÜDKE ROSSETTI

**DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA E DAS RESERVAS DE GLICOGÊNIO E DE
FOSFAGÊNIO EM TECIDOS DE CARANGUEJOS *Neohelice granulata*
ALIMENTADOS COM UMA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS OU PROTEÍNAS E
SUBMETIDOS À ANOXIA E À FASE DE RECUPERAÇÃO DA ANOXIA**

**Trabalho de Conclusão submetido à Comissão de
Graduação em Ciências Biológicas da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.**

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Roselis Silveira Martins da Silva

Porto Alegre, 2010.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Roselis Silveira Martins da Silva, pela orientação, confiança e principalmente por todos os ensinamentos que contribuíram com a minha formação.

Ao Prof. Luiz Carlos Rios Kucharski pela acolhida no laboratório, pelo incentivo e por todas as instruções que enriqueceram este trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq que, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – Pibic, concederam Bolsa de Estudos ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia Comparada, pelos ensinamentos sobre as técnicas realizadas neste trabalho, pelo auxílio nos experimentos e por proporcionarem um ambiente de trabalho rico e acolhedor.

RESUMO

O *Neohelice granulata* é um caranguejo da família Grapsidae (Decapoda, Crustacea), sendo uma espécie típica de estuários. Populações de *N. granulata* costumam sofrer períodos prolongados de hipóxia ou anoxia porque em seu hábitat a concentração de O₂ dissolvida na água pode variar de 2,80 mg O₂/L a 11,78 mg O₂/L, podendo chegar a valores próximos de zero durante o inverno, quando os animais permanecem recolhidos às tocas. Além disso, quando os caranguejos saem em busca de alimento permanecem longos períodos fora d'água, suportando períodos de hipóxia ou anoxia ambiental.

Diversos autores postulam que invertebrados e vertebrados que suportam amplas variações do teor de oxigênio ambiental usam como estratégia o armazenamento de altas concentrações de glicogênio e de arginina fosfato nos tecidos. Em crustáceos, a concentração de arginina fosfato muscular é significativamente mais elevada que a verificada em insetos ou a concentração de creatina fosfato no músculo de vertebrados. Por outro lado, as concentrações de ATP, AMP e ADP em crustáceos não são muito elevadas. Sendo assim, a arginina fosfato seria um importante substrato energético para o *N. granulata* nos períodos de anoxia ambiental.

O presente trabalho teve como objetivo analisar as mudanças metabólicas em tecidos do caranguejo *Neohelice granulata* induzidas pela administração de uma dieta rica em proteínas (HP) e uma dieta rica em carboidratos (HC) e pela exposição dos animais às condições anóxicas e de recuperação pós-anoxia. Para isso, 48 caranguejos *N. granulata* machos foram coletados na lagoa Tramandaí (RS, Brasil). Após 10 dias de aclimatação às condições laboratoriais, um grupo de caranguejos passou a receber a dieta HC e outro a dieta HP durante 15 dias. Então os animais de cada dieta foram divididos em 3 grupos: um grupo controle, que permaneceu em normóxia (18,95% de O₂ dissolvido na água); um grupo anoxia, que permaneceu em 0% de O₂ dissolvido na água durante uma hora; e um grupo recuperação pós-anoxia, onde os animais foram submetidos à anoxia e após colocados por três horas em normóxia. Ao final dos períodos experimentais, foram coletadas amostras de músculo da mandíbula, de hepatopâncreas e das brânquias anteriores e posteriores, as quais foram utilizadas para a determinação das concentrações de arginina fosfato e glicogênio. A hemolinfa desses animais foi coletada das articulações do 4° e 5° pereiópodos e utilizada para as determinações bioquímicas de glicose.

Animais em normóxia alimentados com a dieta HC apresentaram valores significativamente maiores de glicemia que os caranguejos alimentados com a dieta HP. Na primeira hora de anoxia ambiental, tanto os animais alimentados com a dieta HP quanto aqueles mantidos com a dieta HC apresentaram um aumento na concentração de glicose hemolinfática.

O aumento da glicose hemolinfática é uma adaptação metabólica ao ambiente anóxico, e parece ser um tipo de preparação fisiológica para a demanda de fermentação do substrato quando as vias anaeróbias são utilizadas. Já após as três horas de recuperação, a glicose na hemolinfa retornou a valores mais próximos daqueles verificados nos grupos controles nos caranguejos alimentados com a dieta HP e com a dieta HC. Provavelmente, na recuperação pós-anoxia, a diminuição da concentração de glicose na hemolinfa nos grupos deve-se ao aumento da utilização de glicose por outros tecidos ou pelo gasto energético devido ao aumento da atividade locomotora do animal.

O músculo da mandíbula de caranguejos HP demonstrou ter concentrações menores de glicogênio que o músculo de animais HC, tanto no grupo controle quanto nos animais submetidos à anoxia e à recuperação pós-anoxia. No grupo controle alimentado com a dieta HP a oxidação de glicose seria uma importante via de geração de energia, justificando, em parte, a menor concentração de glicogênio verificada no músculo de caranguejos alimentados com essa dieta. Por outro lado, o hepatopâncreas e as brânquias anteriores e posteriores não apresentaram diferenças na concentração de glicogênio entre caranguejos alimentados com a dieta HP e HC e os tratamentos também não causaram nenhuma modificação significativa neste tecido. Oliveira et al. (2001) encontrou que o hepatopâncreas apresentou uma diminuição na captação de glicose e na síntese e mobilização de glicogênio somente após duas horas em anoxia. A anoxia por uma hora também não afetou a capacidade de captação de glicose e de síntese e mobilização de glicogênio em ambas as brânquias do grupo HP e HC. Esses resultados podem estar demonstrando que uma hora de anoxia não é suficiente para provocar alterações nas reservas de glicogênio no hepatopâncreas e nas brânquias.

Altas reservas de arginina fosfato foram encontradas no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas dos animais estudados. Essa característica, juntamente com os altos níveis de glicogênio encontrados nessa espécie, podem explicar parcialmente a alta resistência de *N. granulata* aos baixos níveis de oxigênio das tocas. Além disso, caranguejos alimentados com a dieta HP mostraram um acréscimo significativo tanto das concentrações de arginina quanto das de arginina fosfato no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas após uma hora em anoxia. Durante esse mesmo período experimental, Marqueze et al. (2006) indicou um aumento na atividade da enzima piruvato quinase e da concentração de ATP e uma redução na concentração de glicogênio no músculo de *N. granulata* alimentados com a dieta HP. Considerando que durante a anoxia os organismos precisam aumentar a produção de energia em um primeiro momento e após diminuir a atividade dos processos que consomem energia, o presente trabalho indica que no primeiro momento o animal está aumentando as reservas de arginina e arginina fosfato para serem usadas posteriormente, caso a anoxia prossiga por mais tempo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	7
OBJETIVOS.....	21
MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
COLETA E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	22
PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	22
DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	24
Determinação da concentração de glicose na hemolinfa.....	24
Determinação da concentração de glicogênio nos tecidos.....	24
Determinação da concentração de arginina e arginina fosfato.....	24
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
RESULTADOS.....	26
CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE NA HEMOLINFA.....	26
CONCENTRAÇÃO DE GLICOGÊNIO NOS TECIDOS.....	27
CONCENTRAÇÃO DE ARGININA E ARGINA FOSFATO NOS TECIDOS.....	30
DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

INTRODUÇÃO

O início da vida na Terra deu-se na ausência de oxigênio e toda a energia era obtida por meio do metabolismo anaeróbico. O surgimento de oxigênio atmosférico por meio da fotossíntese realizada pelas algas verdes-azuis, e seu estabelecimento na proporção de 21% da atmosfera, iniciou uma nova etapa na história da vida. A evolução de eficientes sistemas respiratórios e circulatórios permitiu aos animais terrestres captarem oxigênio e garantir o aporte adequado deste para os órgãos. Por sua vez, os animais aquáticos também desenvolveram modificações que os permitiram captar oxigênio da água, no entanto, apenas 3% do valor de oxigênio dissolvido no ar está presente no meio aquático. Além disso, a quantidade de oxigênio dissolvida na água depende de uma série de fatores como a temperatura, a salinidade e a decomposição da matéria orgânica. (Gäde, 1983; Lutz e Storey, 1997; Schmidt-Nielsen, 2002). Por fim, tanto a mistura como a difusão dos gases são mais rápidas no ar que na água, de modo que regiões de hipóxia local se desenvolvem mais frequentemente no meio aquático (Randall et al., 2000).

Existe uma infinidade de espécies que são tolerantes à variação de oxigênio no meio. Também muito diversos são os recursos que permitem que elas suportem os ambientes hipóxicos/anóxicos, sendo o principal a obtenção de energia através de processos anaeróbicos. A anaerobiose é dividida em dois subtipos: 1 – a anaerobiose dependente do hábitat ou anaerobiose ambiental, que ocorre quando o organismo é submetido a um micro-hábitat com condições anóxicas; e 2 – a anaerobiose dependente de atividade ou anaerobiose funcional, que ocorre devido a um aumento da atividade de um determinado tecido, geralmente o muscular, excedendo assim sua capacidade aeróbia de produção energética. Na anaerobiose funcional o organismo necessita de uma disponibilidade energética imediata para enfrentar uma situação de duração relativamente curta como, por exemplo, a fuga de um predador, mesmo que a mesma apresente custo elevado. Já na anaerobiose ambiental, a qual foi estudada no presente trabalho, o organismo precisa utilizar processos energéticos econômicos, pois a situação hipóxica/anóxica pode persistir por vários dias. Assim, os dois tipos de anaerobiose relacionam-se a processos metabólicos distintos (Gäde, 1983; Urich, 1994; Lutz e Storey, 1997).

Parece existir uma relação entre o hábitat e a tolerância do animal à anoxia. Os vertebrados são, caracteristicamente, animais intolerantes à interrupção do suprimento de oxigênio. Poucos vertebrados resistem a períodos severos de hipóxia e praticamente nenhum resiste à anoxia crônica (Lutz, 1992). Exceções a essa regra são encontradas entre os peixes (duas espécies de ciprinídeos) e os répteis (as tartarugas de água doce); esses organismos

tornaram-se modelos para o estudo da resistência à anoxia em vertebrados. No entanto, organismos que contam com processos anaeróbios de produção de energia são comuns em alguns grupos de invertebrados, especialmente crustáceos e moluscos (Gäde, 1983; Lutz e Storey, 1997).

O *Neohelice granulata* (Dana, 1851) é um caranguejo da família Grapsidae (Decapoda, Crustacea) típico de estuários. Ele habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, passando por toda a costa do Uruguai até o golfo de San Martín, na Argentina (Botto e Irigoyen, 1980; Bond-Buckup et al., 1991). Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes límnicos e marinho, sendo caracterizados por períodos irregulares de total cobertura de água e outras de completa exposição do substrato. Esses ecossistemas sofrem influência de fatores oceanográficos e meteorológicos e, assim, impõem à sua biota um elevado estresse ambiental devido à variação extrema de fatores como a salinidade, a temperatura, a concentração de oxigênio dissolvido na água e os ciclos das marés (Cooper, 1974; Odum, 1985).

Em seu hábitat esse caranguejo distribui-se por áreas com ou sem vegetação onde abre galerias ou tocas com profundidades variáveis de acordo com o nível das marés e do lençol freático. Esse procedimento garante a presença de água no fundo da toca e minimiza as variações de salinidade, temperatura e teor de oxigênio (Turcato, 1990). Os animais maiores, principalmente os machos, são facilmente encontrados em locais abertos, enquanto as fêmeas e os animais jovens buscam refúgio junto à vegetação ribeirinha (Bond-Buckup et al., 1991) formada, em grande parte, por juncos. Nos meses de primavera e de verão esses caranguejos são encontrados na zona infralitoral em busca de alimento. Já nos meses de outono e de inverno permanecem no interior das tocas por um período maior e apresentam redução na atividade metabólica (D’Incao et al., 1988; Turcato, 1990).

O *Neohelice granulata* é considerado um animal semi-terrestre. Isso porque, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos et al., 1987), ele é capaz de suportar longos períodos fora d’água, quando sai em busca de alimento (Mañe-Gazon et al., 1974). Esse comportamento é possível devido ao surgimento de adaptações: a interiorização das brânquias na cavidade branquial; a presença de tufo de cerdas entre as bases dos pereiópodos que apresentam a função de transferir água para dentro da câmara branquial; e a manutenção de uma corrente de circulação de água através da superfície externa do corpo. Estas adaptações têm como finalidade a oxigenação (Hartnol, 1988), bem como a eliminação do gás carbônico quando em respiração aérea (Bond-Buckup et al., 1991).

Na lagoa Tramandaí-RS, onde populações de *N. granulata* são encontradas em abundância e onde foram coletados os animais utilizados neste estudo, os caranguejos sofrem períodos prolongados de hipóxia ou de anoxia, pois a concentração de O₂ dissolvida na água pode variar de 2,80 mg O₂/L a 11,78 mg O₂/L, podendo chegar a valores próximos de zero durante o inverno quando os animais permanecem recolhidos às tocas (Turcato, 1990). Entre os crustáceos, o tempo letal médio (TL50) de exposição a um ambiente anóxico pode variar de poucas horas, como em *Ornectes limosus* (Gäde, 1983) e *Gammarus fossarum* (Hervant et al., 1995), até vários dias, como em *Calianassa californiensis* (Thompson e Pritchard, 1969). Em *N. granulata*, aproximadamente 80% dos animais sobreviveram quando submetidos a 12 horas de anoxia (Oliveira et al., 2000). Nesta mesma espécie, Gonçalves (1993) observou um tempo letal médio (TL50) de 19h e 45 min.

Para suportar esses períodos de restrição de O₂, os caranguejos podem utilizar estratégias como a modificação de suas respostas comportamentais, respiratórias, circulatórias e de afinidade da hemocianina ao O₂. Hervant et al. (1995), após submeterem duas diferentes espécies de crustáceos (*Niphargus rhenorhodanensis* e *Gammarus fossarum*) a uma severa hipóxia ambiental e à fase de recuperação pós-hipóxia, constataram que, em ambas as espécies, houve uma diminuição significativa da atividade locomotora na primeira hora de hipóxia enquanto que, durante o período de recuperação da hipóxia, os animais aumentaram significativamente a atividade locomotora. Mesmo assim, a atividade de locomoção no período de recuperação não atingiu àquela observada no grupo controle em normóxia. Os mesmos autores também constataram hiperventilação, em ambas as espécies, nas primeiras horas de hipóxia severa. Estudos com o caranguejo *N. granulata* mostraram que houve redução do consumo de oxigênio e da atividade de locomoção após duas horas de exposição à hipóxia ambiental (Santos et al., 1987). Gonçalves (1993) também constatou uma diminuição da atividade motora e da frequência cardíaca em *N. granulata* submetido à anoxia ambiental durante 12 horas.

Em relação ao comportamento alimentar, o caranguejo *Neohelice granulata* é uma espécie onívora-detritívora que se alimenta, principalmente, de vegetais e detritos (Bond-Buckup, 1991). Análises do conteúdo estomacal desses animais concluíram que eles possuem hábito oportunista, pois no outono e no inverno foram encontradas maiores quantidades de vegetais, já na primavera foi encontrada maior frequência de itens de origem animal, e no verão houve equilíbrio entre os dois itens alimentares (D’Incao et al., 1990). Além disso, o *N. granulata* eventualmente alimenta-se de animais em avançado estado de decomposição e comporta-se como canibalista, atacando suas próprias comunidades (Botto e Irygoyen, 1980).

Ainda em relação à alimentação, o *N. granulata* possui a capacidade de se adaptar facilmente a diferentes dietas e, assim como em vertebrados, a composição da dieta influencia o padrão do metabolismo de carboidratos. Em animais alimentados com uma dieta rica em proteínas (HP), os valores da glicemia hemolinfática e a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo estão reduzidos. Já em animais alimentados com uma dieta rica em carboidratos (HC) a homeostase do metabolismo de carboidratos fica revertida: há elevação dos níveis glicêmicos e das concentrações de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo (Kucharski e Da Silva, 1991).

As principais vias do metabolismo de carboidratos começam ou terminam com glicose. Já foi demonstrado que fatores hormonais, ambientais e nutricionais controlam a homeostase da glicose em crustáceos (Lynch e Weeb, 1973; Sedlmeier, 1985; Santos et al., 1988). Além disso, estudos sobre o metabolismo de carboidratos nesses animais têm demonstrado a presença das vias da glicogênese, da glicogenólise, da glicólise, da gliconeogênese e da neoglicogeniogênese em diferentes tecidos (Loret et al., 1989; Vinagre e Da Silva, 1992; Schmitt e Santos, 1993; Oliveira e Da Silva, 1997; Marqueze et al., 2006; Maciel et al., 2008).

Em todas as células, a via básica para a produção de ATP na ausência de oxigênio é a glicólise (Figura 1). A produção energética das vias anaeróbicas é ineficiente, uma vez que a glicólise produz menos do que 10% do ATP gerado pelo metabolismo aeróbio. Assim, a formação efetiva de ATP por mol de substrato fermentado é de 3 moles se o substrato for o glicogênio e 2 moles se o substrato for a glicose. Devido à baixa eficiência glicolítica, os organismos podem adotar estratégias distintas para manter a carga energética durante a anoxia: a primeira é o aumento da velocidade da glicólise; a segunda é a redução da atividade dos processos que consomem energia – a depressão metabólica; e a terceira é a manutenção, em todos os tecidos, de altas concentrações de glicogênio e fosfato (ex. arginina fosfato). A duração e a eficiência do processo de recuperação são de importância funcional, com a rápida reposição dos valores das reservas energéticas e a remoção dos produtos finais acumulados durante a anoxia (Hervant et al., 1999).

A gliconeogênese é a via responsável pela síntese de glicose a partir de precursores como lactato, glicerol, aminoácidos, piruvato e propionato. Em mamíferos ela ocorre no fígado, nos rins e no intestino delgado (Moon, 1988; Marks et al., 1996; Corssmitt et al., 2001; Mithieux et al., 2004; Habold et al., 2005) e é conhecida por modular as mudanças de volume celular de hepatócitos (Lang, 1998; Quillard, 1997). Em invertebrados, a presença das quatro enzimas-chave dessa via, a piruvato carboxilase (PC), a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), a frutose-1-6-bifosfatase (FBFase) e a glicose-6-fosfatase (G6Pase) já foi

evidenciada. Visto que essas enzimas são encontradas desde fungos até mamíferos, acredita-se que a gliconeogênese é filogeneticamente antiga (Moon, 1988).

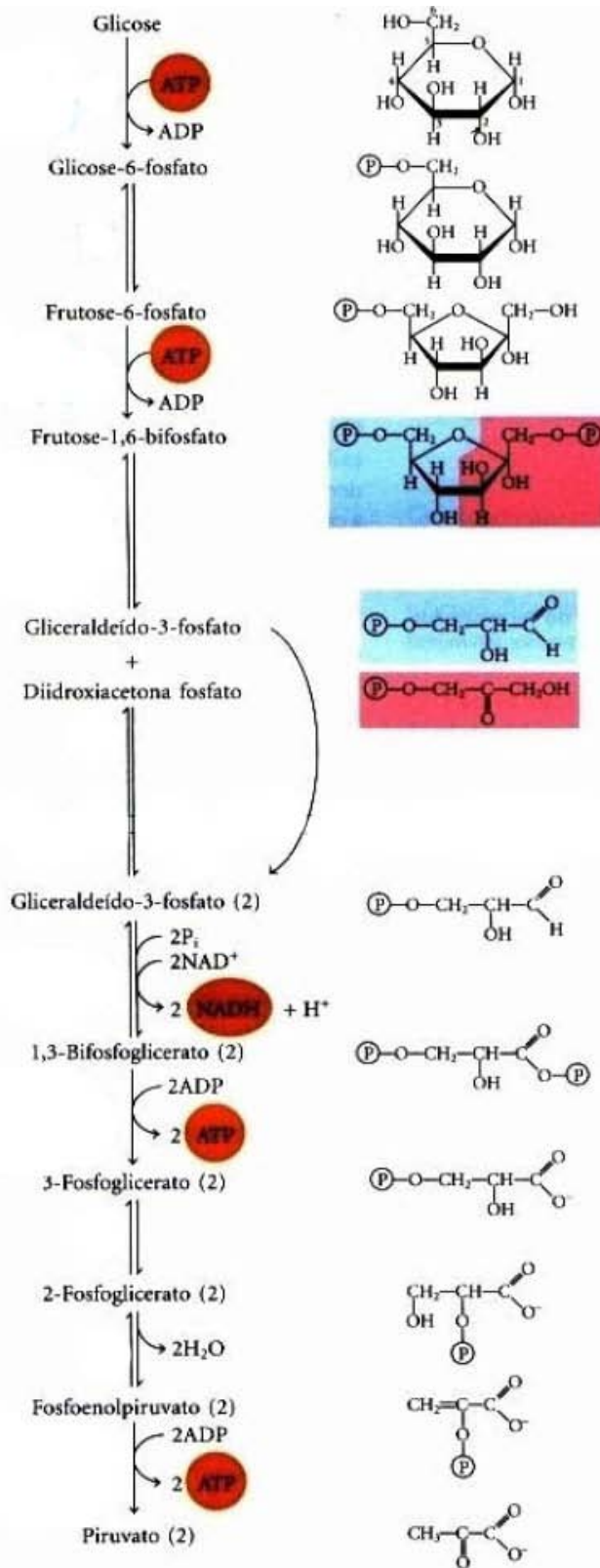


Figura 1: Vias glicolítica e gliconeogênica. Adaptado de Lehninger et al., 2006.

Em invertebrados, a via gliconeogênica foi evidenciada em uma variedade de espécies: a presença de enzimas da via gliconeogênica foi verificada em corpos gordurosos de baratas (Storey e Baleiy, 1978) e no parasita *Schistosoma mansoni* (Tielens et al., 1991); a atividade da PEPCK foi encontrada no músculo do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus* e da lagosta *Homarus vulgaris*, sendo que os autores sugeriram que ela seja parte da via de oxidação de alguns aminoácidos nos músculos desses animais (Zammit e Newsholme, 1978).

Em crustáceos, a capacidade gliconeogênica foi constatada no hepatopâncreas (Munday e Poat, 1971; Oliveira e Da Silva, 1997), nas brânquias (Thabrew et al., 1971; Chittó, 2005), nos hemócitos (Johnston e Davies, 1973) e no músculo (Schein et al., 2004). A atividade da PEPCK e da FBFase foi demonstrada em tecidos do siri *Callinectes sapidus* (Lallier e Walsh, 1991), de caranguejos *Chaceon fenneri* e *Chaceon quinquendens* (Walsh e Henry, 1990) e em crustáceos hipógenos e epígenos (Hervant, 1996).

Oliveira e Da Silva (1997) demonstraram, pela primeira vez, a presença da via gliconeogênica e da atividade da PEPCK no hepatopâncreas do caranguejo *N. granulata*. Nessa espécie a via gliconeogênica estaria envolvida em vários processos de ajuste metabólico durante o estresse osmótico, a anoxia e a fase de recuperação da anoxia (Schein et al., 2004; Chittó, 2000, 2005). A comparação da capacidade de síntese de glicose a partir de [¹⁴C] - alanina em relação àquela a partir de [¹⁴C] - lactato demonstrou que o substrato preferencial para a síntese de glicose pelo hepatopâncreas é a alanina. Além disso, em animais alimentados, a capacidade intrínseca do hepatopâncreas em sintetizar glicose é alta e independe da composição da dieta administrada aos caranguejos. Os autores sugeriram que a manutenção de uma alta atividade gliconeogênica permite ao *N. granulata* adaptar-se às variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, a temperatura, o ciclo de marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose (Oliveira e Da Silva, 1997).

Em outro trabalho com *N. granulata*, Oliveira et al. (2001) submeteram os caranguejos à 8 horas de anoxia e 12 horas de recuperação pós-anoxia. Eles verificaram que os valores de glicose na hemolinfa aumentam significativamente durante o período de anoxia ambiental, no entanto, nos animais alimentados com a dieta HC, esses valores foram significativamente maiores que aqueles dos caranguejos mantidos com a dieta HP. Durante a fase de recuperação, os níveis de glicose na hemolinfa voltaram rapidamente aos valores semelhantes àqueles dos animais em normóxia, não sendo constatada diferença significativa entre os animais alimentados com as dietas HC e HP. Contudo, após 12 horas em recuperação esses animais apresentaram valores de captação de glicose no hepatopâncreas significativamente reduzidos quando comparados àqueles dos animais em normóxia. Logo, o aumento na captação de glicose deve ter ocorrido nas primeiras horas de recuperação.

A clonagem molecular da PEPCK muscular (GenBank AY074922) do caranguejo *N. granulata* confirmou sua localização na fração mitocondrial (Schein et al., 2004). A sequência nucleotídica do cDNA da PEPCK do *N. granulata* tem 80% de semelhança com a sequência da PEPCK de outros Malacostraca. Também foi verificada a expressão da enzima no hepatopâncreas, no sistema nervoso, no coração e nas brânquias de *N. granulata*. Em vertebrados, tem sido demonstrado que a expressão do gene da PEPCK mitocondrial é constitutiva (Hanson e Reshef, 1997). Entretanto, foi constatado um aumento na atividade e nos níveis de RNAm da PEPCK mitocondrial de *N. granulata* após um dia de estresse hiperosmótico, acompanhado do aumento da capacidade gliconeogênese a partir de alanina (Schein et al., 2004). Chittó (2000) verificou que a atividade da enzima PEPCK nas brânquias posteriores e anteriores do caranguejo *Neohelice granulata* foi predominante na fração mitocondrial durante o inverno. No verão, não houve variação entre as frações mitocondrial e citosólica nos animais controle. Contudo, somente a atividade da PEPCK citosólica diminuiu após um dia de estresse hiperosmótico e após três dias de estresse hiposmótico em brânquias anteriores e posteriores, respectivamente, quando comparada ao grupo controle.

A glicose é armazenada primariamente sob a forma de glicogênio. Em vertebrados, o glicogênio é encontrado na forma de diminutos grânulos intracelulares, principalmente no fígado e nas células musculares. Invertebrados também armazenam glicogênio intracelularmente no fígado e no músculo, mas crustáceos também possuem células especializadas, chamadas hemócitos, que armazenam glicogênio e estão presentes na hemolinfa. A ausência de um depósito central de glicogênio é uma adaptação importante para animais que possuem o sistema circulatório do tipo aberto com baixa pressão e fluxo lento, como o *N. granulata*, e que, em seu hábitat, são submetidos a períodos de hipóxia ambiental, pois só assim eles conseguem obter uma distribuição efetiva de glicose para os tecidos (Hochachka e Somero, 1984). Mesmo assim, o ciclo de armazenamento/mobilização de glicogênio e as concentrações de glicose hemolinfática sofrem flutuações marcantes em consequência do estágio da muda, da estação do ano, da dieta oferecida, do estado alimentar, do ciclo circadiano, da salinidade do meio e do teor de oxigênio dissolvido na água (Loret et al., 1989; Vinagre e Da Silva, 1992; Kucharski e Da Silva, 1991; Oliveira et al., 2004 a,b).

O processo de formação do glicogênio a partir das moléculas de glicose é chamado de glicogênese. Para iniciar a síntese do glicogênio, a glicose-6-fosfato é convertida em glicose-1-fosfato pela reação catalisada pela fosfoglicomutase. O produto dessa reação é convertido em UDP-glicose pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. A UDP-glicose é doadora imediata de resíduos de glicose na reação catalisada pela glicogênio sintase, e esta promove a transferência do resíduo de glicose da UDP-glicose para a extremidade não-redutora de uma ramificação da

molécula de glicogênio (Figura 2). A glicogênio sintase não pode sintetizar as ligações encontradas nos pontos de ramificação do glicogênio; essas ligações são formadas pela enzima de ramificação do glicogênio, também chamada de glicosil-(4→6)-transferase. O efeito biológico da introdução de ramificações é tornar a molécula de glicogênio mais solúvel e aumentar o número de extremidades não-redutoras. Isso aumenta o número de sítios acessíveis à ação da fosforilase do glicogênio e da glicogênio sintase, duas enzimas que agem apenas nas extremidades não-redutoras (Lehninger et al., 2006).

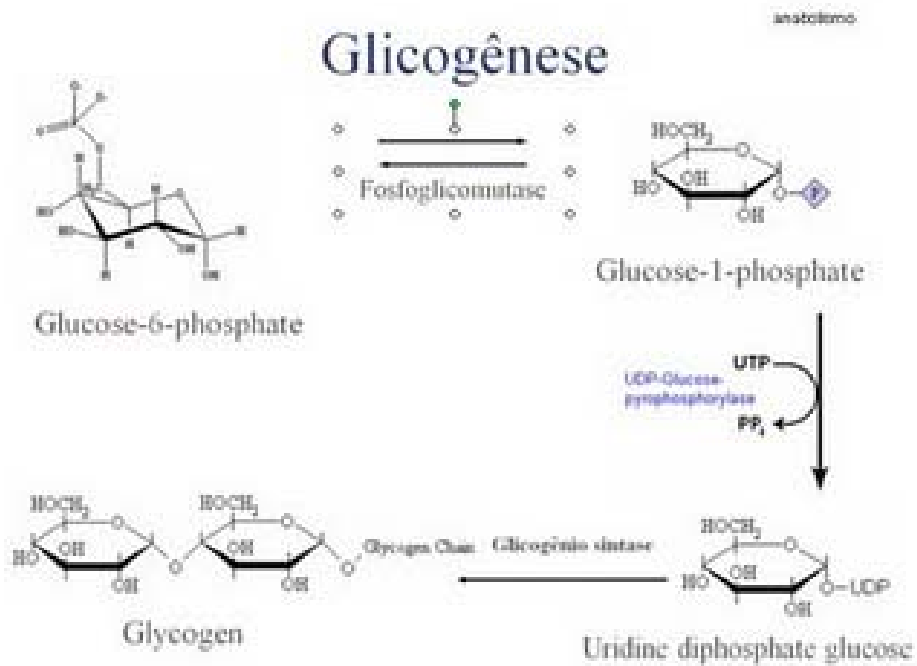


Figura 2: Via glicogênica. Adaptado de Lehninger et al., 2006.

Por outro lado, a quebra do glicogênio é conhecida como glicogenólise. Essa via permite que as unidades de glicose das ramificações externas do glicogênio entrem na via glicolítica através da ação de três enzimas: a fosforilase do glicogênio, a enzima desramificadora do glicogênio e a fosfoglicomutase. A fosforilase do glicogênio catalisa a reação na qual o fosfato inorgânico (P_i) ataca a ligação glicosídica entre dois resíduos de glicose localizados em uma extremidade da molécula de glicogênio, e com isso um resíduo de α -glicose é removido como α -D-glicose 1-fosfato. A degradação do glicogênio pode prosseguir somente após a ação da enzima de desramificação, que promove duas reações sucessivas que transferem a ramificação. Uma vez transferidos os resíduos de glicose restantes da ramificação e hidrolisada a ligação no C-6, a atividade da fosforilase pode continuar. Por fim, a glicose-1-fosfato, o produto final da reação da fosforilação do glicogênio, é convertida em glicose-6-

fosfato pela ação da fosfoglicomutase (Figura 3). A glicose-6-fosfato formada do glicogênio no músculo pode entrar na glicólise e servir como fonte de energia para a contração muscular (Lehninger et al., 2006). No fígado, a quebra do glicogênio serve a um propósito diferente: lançar glicose na circulação quando sua concentração diminui, como acontece no jejum ou em situações de estresse, como a anoxia.

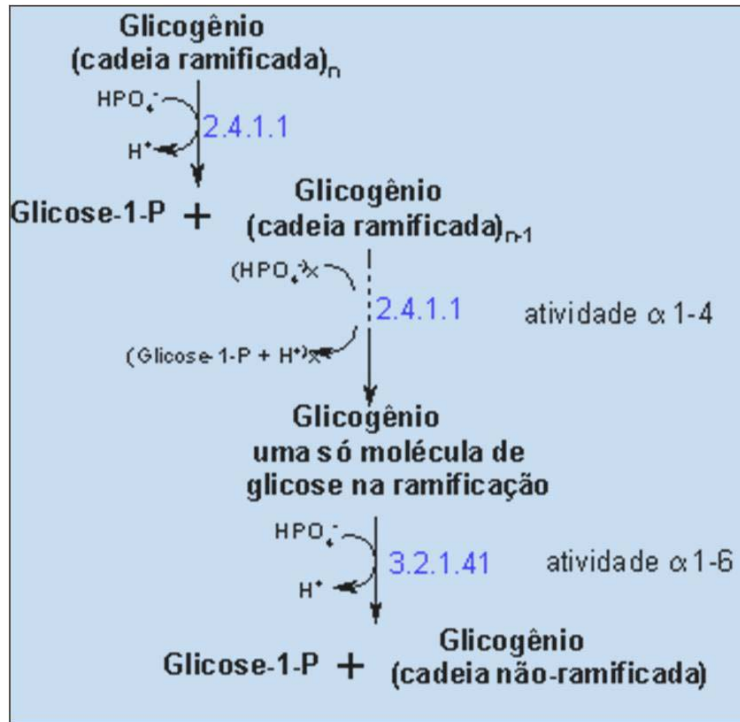


Figura 3: Via glicogenólica. Adaptado de Lehninger et al., 2006.

Em crustáceos, mudanças nas concentrações de glicogênio foram observadas em animais sob estresse de hipóxia ou anoxia. Camarões da espécie *Marsupenaeus japonicus*, sob hipóxia (valores de PO₂ entre 1,3 e 1,7 mg/L) durante 6 horas, mostraram decréscimo nas concentrações de glicogênio muscular durante as duas últimas horas de hipóxia. No entanto, uma redução ainda maior nos valores de glicogênio foi encontrada durante a recuperação. Já no hepatopâncreas, a concentração de glicogênio foi apenas metade daquele encontrado no músculo, e essa quantidade decaiu significativamente durante as duas últimas horas de hipóxia. Em contraste ao músculo, as concentrações de glicogênio no hepatopâncreas aumentaram durante a recuperação, atingindo os valores encontrados no controle (Abe et al., 2007).

Estudando o efeito de diferentes tempos de jejum sobre a capacidade gliconeogênica, a concentração de glicogênio hepatopancreático e a concentração de glicose na hemolinfa de *N. granulata* previamente alimentados com dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos,

Oliveira et al. (2004b) constataram, nos animais alimentados com a dieta rica em proteínas, que a concentração de glicose na hemolinfa foi mantida principalmente pela gliconeogênese. No entanto, nos animais mantidos previamente com a dieta rica em carboidratos, o glicogênio foi o principal substrato energético utilizado durante o jejum.

Em normóxia, os níveis de glicogênio no músculo da mandíbula de caranguejos *N. granulata* são significativamente menores em animais alimentados com a dieta HP que em animais alimentados com a dieta HC. O conteúdo de glicogênio desse tecido decresce significativamente depois de uma hora de anoxia em ambas as dietas. No entanto, a concentração de glicogênio em animais HP foi menor que em animais HC. Durante o período de recuperação a concentração de glicogênio aumentou nos animais alimentados com a dieta HC, mas permaneceu inalterada nos caranguejos HP comparado ao grupo anoxia. Contudo, a diferença entre a concentração de glicogênio nos grupos HP e HC observada na normóxia foi mantida nos caranguejos submetidos à anoxia e após à recuperação pós-anoxia (Marqueze et al., 2006). Nesse mesmo trabalho, uma hora de anoxia estimulou a atividade glicolítica no músculo de caranguejos alimentados com a dieta HP e a manutenção dos animais em normóxia por três horas não reduziu os valores da atividade da enzima piruvato quinase.

Quando caranguejos *N. granulata* dos grupos HC e HP foram submetidos à anoxia ambiental durante 8 horas somente a concentração de glicogênio muscular do grupo HC diminuiu significativamente. Contudo, durante a fase de recuperação da anoxia os valores de glicogênio no músculo do grupo HC aumentaram significativamente quando comparados aqueles dos grupos normóxia e anoxia. Contrariamente, no grupo alimentado com a dieta HP, os valores de glicogênio muscular diminuíram significativamente durante o período de recuperação da anoxia (Oliveira, 1997).

Oliveira et al. (2001) também verificaram que, durante o período de recuperação, a síntese de glicogênio aumentou, atingindo valores superiores àqueles dos animais em normóxia e em anoxia. Já a mobilização do ¹⁴C-glicogênio no hepatopâncreas está aumentada durante o período de anoxia e reduzida na fase de recuperação. Corroborando com esses resultados, as atividades das enzimas glicogênio fosforilase total e na forma a aumentam nas primeiras horas de anoxia, acarretando uma diminuição significativa nos valores de glicogênio hepatopancreático. Durante a fase de recuperação a relação das enzimas glicogênio sintase I/glicogênio fosforilase a aumenta (Oliveira et al., 2001)

Diferentemente de outros invertebrados, os crustáceos utilizam somente uma via de glicólise anaeróbica: a fermentação de glicogênio em lactato, conhecida como neoglicogeniogênese (Bridges e Brand, 1980; Hervant et al., 1995, 1997, 1999 a e b). O L-

lactato é acumulado na hemolinfa e em diferentes tecidos após situações de anoxia ou hipóxia, tanto ambiental como funcional (Van Aardt, 1988; Henry et al., 1994; Hervant et al., 1995, 1996 e 1997; Oliveira et al., 2004a). Além das situações de baixa concentração de oxigênio dissolvido na água, os crustáceos também produzem altas concentrações de L-lactato durante o exercício extenuante, sendo este metabólito responsável pela acidose induzida pelo exercício físico nesses animais (Wood e Randall, 1981; Henry et al., 1994; Morris e Adamczewska, 2002). O aumento da concentração de L-lactato estaria associado a uma marcante mobilização do glicogênio tecidual (Chang e O'Connor, 1983; Hervant et al., 1999; Morris e Adamczewska, 2002; Oliveira et al., 2004a).

Em *N. granulata* alimentados com dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) os valores de L-lactato na hemolinfa aumentaram 14 vezes após os animais serem submetidos à anoxia ambiental por 8 horas, porém não foram constatadas diferenças significativas entre os animais mantidos com as dietas HC e HP. O glicogênio muscular parece ser a principal fonte deste L-lactato (Oliveira et al., 2004a). Já durante a fase de recuperação, o L-lactato hemolinfático retorna a valores semelhantes ao do grupo controle mais lentamente no grupo HC que no grupo HP. No grupo HP essa diminuição foi acompanhada pelo aumento da conversão de [¹⁴C]-L-lactato em [¹⁴C]-glicose, e pela elevação da atividade das enzimas lactato desidrogenase e PEPCCK hepatopancreáticas. Nesse período, a gliconeogênese hepatopancreática teria um papel fundamental na metabolização do L-lactato formado ao longo do período de anoxia, somente nos animais alimentados com a dieta HP (Oliveira et al., 2004a).

As concentrações de ATP, AMP e ADP em crustáceos não são muito elevadas. Recentemente, foi demonstrado que caranguejos *Neohelice granulata* alimentados com uma dieta HC apresentavam valores de ATP no músculo e no hepatopâncreas significativamente maiores que aqueles verificados em caranguejos mantidos com a dieta HP. Quando esses caranguejos foram submetidos à anoxia por 1 hora os valores de ATP diminuiram nos animais alimentados com a dieta HC e aumentaram naqueles mantidos com a dieta HP. Na fase de recuperação pós-anoxia (3h) os valores de ATP no músculo e no hepatopâncreas foram similares aqueles do grupo normóxia nos caranguejos alimentados com a dieta HP mas significativamente menores dos animais do grupo HC (Marqueze et al., 2006).

No entanto, a concentração de arginina fosfato muscular é significativamente mais elevada em crustáceos do que aquela verificada em insetos ou a concentração de creatina fosfato no músculo de vertebrados (Beis e Newsholme, 1975; Hill et al., 1991; Speed et al., 2001; Morris and Adamczewska, 2002). Diversos autores postulam que invertebrados que suportam amplas variações do teor de oxigênio ambiental, além de armazenarem altas concentrações de glicogênio, usam como estratégia o armazenamento de arginina fosfato nos tecidos (Hill et al.,

1991; Henry et al., 1994; Speed et al., 2001; Morris e Adamczewska, 2002). Isso porque, em ambientes onde a concentração de oxigênio dissolvida na água se aproxima dos valores considerados críticos, os crustáceos necessitam recrutar vias alternativas para obter ATP. A glicólise anaeróbica leva ao acúmulo de lactato e a fermentação dessa substância é associada com baixa tolerância (sobrevivência de curto-prazo) sob anoxia porque o substrato, principalmente o glicogênio, é rapidamente consumido (Hochachka, 1980; Holman e Hand, 2009). Ao contrário, a arginina fosfato é uma fonte rápida e imediatamente acessível de energia metabólica, e a sua recuperação é mais rápida que a recuperação das reservas de ATP (England e Baldwin, 1983; Weinstein e Full, 1998).

A arginina está envolvida em várias vias e reações metabólicas essenciais, como o ciclo da uréia, e é encontrada principalmente em tecidos musculares e no fígado. Ela é o produto da degradação da arginina fosfato, que é uma fonte de fosfato de alta energia por regenerar ATP a partir de ADP através da ação de uma arginina quinase. Esse processo é bastante conhecido por prover energia durante atividade muscular intensa para crustáceos decápodes (Bergmeyer, 1985; Morris e Adamczewska, 2002). No entanto, há indícios que a arginina fosfato também seja uma fonte potencial de energia durante a hipóxia (Hill et al., 1991; Speed et al., 2001).

Adamczewska e Morris (2001), estudando o caranguejo terrestre *Gecarcoidea natalis*, perceberam que o mesmo empreende uma surpreendente migração reprodutiva anual durante a qual caminha mais de um quilômetro por dia, por vários dias sucessivos. Submetendo esses caranguejos a um protocolo de exercício, eles constataram que um regime de 2,5 minutos de caminhada seguido de 2,5 minutos de descanso, durante um total de 10 minutos de caminhada (2.5:2.5), não promoveu uma mobilização de glicogênio significativa no músculo da perna do *G. natalis*. No entanto, após o regime que consistia em 4 minutos de caminhada seguida de 1 minuto de descanso - em um tempo total de caminhada de 16 minutos (4:1) - o conteúdo de glicogênio diminuiu significativamente e mostrou uma recuperação lenta nas 5 horas que sucederam o exercício. Ao mesmo tempo, eles determinaram o conteúdo de arginina e arginina fosfato dos caranguejos nos mesmos regimes de exercício. No músculo da perna de caranguejos sem movimentação havia mais arginina fosfato que arginina. Após o regime de exercício 2.5:2.5 esse padrão mudou significativamente já que grandes quantidades de arginina fosfato foram desfosforiladas a arginina, e então a quantidade de arginina excedeu a de arginina fosfato. Essa depleção da arginina foi ainda mais pronunciada depois do regime 4:1 e continuou por, pelo menos, 5 minutos do período de recuperação. Após 30 minutos de recuperação a concentração de arginina fosfato retornou a valores próximos a da arginina e após 5 horas de recuperação as concentrações de arginina e arginina fosfato eram indistinguíveis das concentrações iniciais em descanso (Morris e Adamczewska, 2002).

No camarão da espécie *Marsupenaeus japonicus* o grande estoque de arginina fosfato, acumulado no músculo durante situações de normóxia, decaiu dramaticamente para um quinto da concentração inicial durante 6 horas de hipóxia. Durante as 4 horas de recuperação a concentração aumentou linearmente até atingir os valores controle. O mesmo comportamento foi observado no hepatopâncreas, no entanto as concentrações de arginina fosfato são menores neste tecido (Abe et al., 2007). O camarão fantasma, *Lepidophthalmus louisianensis*, é um crustáceo decápode encontrado em galerias de até vários metros de profundidade, construídas dentro de sedimentos anóxicos de estuários no Golfo do México. Quando submetido à anoxia o “pool” de arginina fosfato, obtido de extratos feitos com o corpo inteiro do animal, declinou lentamente durante as 48 horas de estresse de ausência oxigênio. A concentração de arginina fosfato foi significativamente mais baixa que àquela encontrada no controle depois de 12, 24 e 48 horas de anoxia. O pool de arginina fosfato retornou aos valores controle depois de 24 horas pós-anoxia (Holman e Hand, 2009).

Os lagostins *Parastacus defossus* e *Parastacus brasilienses* também tiveram os níveis de arginina e arginina fosfato determinados sob condições de hipóxia. *P. defossus*, espécie que vive em tocas subterrâneas, mostrou redução nos níveis de arginina no hepatopâncreas durante períodos de hipóxia de 1, 2, 4 e 8 horas. Já as concentrações de arginina fosfato nesse tecido aumentaram depois de 2 horas de hipóxia, diminuíram significativamente depois de 4 horas e então aumentaram depois de 8 horas. O músculo abdominal dessa espécie mostrou redução nos níveis de arginina após 1 hora de hipóxia e permaneceu estável durante o restante do período experimental. A concentração de arginina fosfato apresentou decréscimo após 2 horas de hipóxia e aumentou até os mais altos níveis observados após 8 horas. Por outro lado, a espécie *P. brasilienses*, que vive em ambientes lóticos bem oxigenados, apresentou aumento nos níveis de arginina do hepatopâncreas após 2 horas de hipóxia, que diminuíram significativamente após 8 horas, enquanto os níveis de arginina fosfato não mostraram modificações nesse tecido. O mesmo ocorreu com as concentrações de arginina no músculo abdominal de *P. brasilienses*, que não sofreram modificações. Já as reservas de arginina fosfato reduziram no músculo em todos os períodos de hipóxia (Da Silva-Castiglioni et al., 2010).

Ao longo dos últimos anos, os estudos sobre o metabolismo intermediário e sua regulação, em invertebrados aquáticos, vêm contribuindo para o conhecimento dos processos evolutivos e adaptativos desses organismos ao seu meio (Kucharski e Da Silva, 1991 a, b; Vinagre e Da Silva, 1992; Oliveira e Da Silva, 1997, 2001, 2004 a, b; Marqueze, 2006). O caranguejo *Neohelice granulata*, em função da excelente aclimação às condições laboratoriais e da grande capacidade para enfrentar as variações de salinidade, temperatura e teor de oxigênio

de seu hábitat, tem se mostrado um excelente modelo biológico para o estudo do metabolismo intermediário em invertebrados.

Em seu hábitat o *N. granulata* enfrenta o desafio de anoxia/recuperação constantemente. Estudos sobre a utilização da glicose, principal substrato energético em crustáceos, e da arginina fosfato pelos tecidos de caranguejos *Neohelice granulata* submetidos a um período curto de anoxia e recuperação, fornecerão informações sobre os ajustes metabólicos envolvidos na aclimatação deste caranguejo ao meio anóxico e como as reservas energéticas são restauradas, no período de recuperação pós-anoxia. A hipótese deste trabalho é a de que há influência da composição da dieta nas vias gliconeogênica, glicogênica e glicogenólica, bem como nas reservas de arginina fosfato, em resposta à anoxia e à fase de recuperação pós-anoxia no caranguejo *N. granulata*.

OBJETIVOS

Em vista do acima exposto, o presente trabalho teve como objetivo geral analisar as possíveis mudanças metabólicas em tecidos do caranguejo *Neohelice granulata* induzidas pela administração de uma dieta rica em proteínas (HP) e uma dieta rica em carboidratos (HC) e pela exposição dos animais às condições anóxicas e de recuperação pós-anoxia, tendo o seguinte objetivo específico:

Avaliar o efeito de uma hora de anoxia e três horas da fase de recuperação pós-anoxia sobre a glicose hemolinfática, a mobilização das reservas de glicogênio e a concentração de arginina e arginina fosfato no músculo da mandíbula, no hepatopâncreas e nas brânquias anteriores e posteriores de caranguejos previamente alimentados com uma dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e manutenção dos animais

Quarenta e oito caranguejos *Neohelice granulata* foram coletados no município de Imbé, Rio Grande do Sul (29°58' sul e 58°08' oeste), em uma região tipicamente estuarina. Esta região é composta tanto por águas oceânicas quanto pelo sistema lagunar de Tramandaí, onde o nível das águas tem influência dos ventos e mares (Würdig, 1984; Bond-Buckup *et al.*, 1991). As coletas foram realizadas manualmente nas tocas, na água ou no sedimento areno-lodoso próximo à vegetação e aconteceram nos meses de verão dos anos de 2009 e 2010. Todos os animais utilizados no experimento eram machos, adultos e em estágio C do ciclo de intermuda de acordo com os critérios morfológicos descritos por Drach e Tchernigovtzeff (1967), para minimizar os efeitos fisiológicos do ciclo reprodutivo e dos períodos de muda.

O transporte dos animais, do local da coleta até o laboratório, foi realizado em caixas plásticas contendo água do próprio local. Ao chegar ao laboratório os caranguejos foram transferidos para uma caixa plástica contendo água destilada com aeração controlada. A realização desse procedimento, por um período de 24 horas, caracteriza um choque hiposmótico para o animal e é utilizado para eliminar possíveis parasitas e esvaziar parte do conteúdo intestinal (Kucharski, 1997). Ao término desse período os caranguejos foram acomodados em um tanque onde permaneceram por um período de dez dias em processo de aclimatação às condições de temperatura de 25°C, fotoperíodo natural (ciclo claro:escuro), salinidade da água de 20‰, PO₂ 18,95% e alimentação *ad libitum* com carne bovina crua.

Procedimentos experimentais

Os caranguejos aclimatados foram separados em dois grupos: um recebeu uma dieta rica em proteínas (carne bovina crua), identificada como dieta HP, e o outro recebeu uma dieta rica em carboidratos (arroz polido cozido), identificada como dieta HC. As duas dietas apresentavam valor calórico semelhante, conforme análise realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS (Tabela 1). Essas dietas foram oferecidas por 15 dias (Kucharski e Da Silva, 1991a) e influenciaram de forma significativa o metabolismo de carboidratos.

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas aos caranguejos. Valores referentes a 100g de alimento.

	Dieta HP (%)	Dieta HC (%)
Proteínas	21,59	3,34
Lipídios	6,71	0,45
Carboidratos	0,03	34,56
Fibras	0,31	0,30
Cinzas	0,03	0,02
Valor calórico total	146,87 kcal	155,65 kcal

Fonte: Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS

Após esse período, os animais de cada dieta foram divididos em três grupos. Um grupo, chamado controle, contou com caranguejos que permaneceram em normóxia (PO_2 18,95%). Em outro grupo, chamado anoxia, os animais foram submetidos por uma hora a anoxia (PO_2 0%). A redução do nível de oxigênio foi obtida por aeração com gás nitrogênio na água dos aquários e monitorada com auxílio de um oxímetro (World Precision Instruments modelo Oxel-1/ ISO_2). Quando o teor de oxigênio na água chegou ao valor desejado os animais foram colocados nos aquários e os mesmos lacrados, contando, a partir desse momento, o período de 1 hora. E o terceiro grupo, chamado recuperação pós-anoxia, foi constituído por animais que permaneceram em anoxia por 1 hora e depois permaneceram outras 3 horas em condições de normóxia (PO_2 18,95%).

Os animais dos três grupos experimentais (controle, anoxia e recuperação) foram submetidos à coleta da hemolinfa das articulações do quarto e do quinto pereiópodos, com a utilização de seringas contendo, como anticoagulante, oxalato de potássio 10%. Após esse procedimento os animais foram crioanestesiados e amostras de tecido do músculo mandibular, do hepatopâncreas e das brânquias anteriores e posteriores foram coletadas e encaminhadas às diferentes experimentações.

Determinações bioquímicas

Determinação da concentração de glicose na hemolinfa

Os níveis de glicose na hemolinfa foram determinados pelo método enzimático da glicose-oxidase com o Kit Glicose ENZ-COLOR (Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda). A leitura das amostras foi realizada em um aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) contra o branco do reagente em comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Determinação da concentração de glicogênio nos tecidos

O isolamento do glicogênio foi realizado segundo o método de Van Handel (1965). Após o sacrifício dos animais os tecidos removidos foram conservados em placas de Petri dispostas sobre gelo e que continham solução fisiológica de caranguejo (481mM NaCl; 12,2mM KCl; 11mM CaCl₂; 93mM MgCl₂.H₂O; 8,8mM H₃BO₃ e 10mM HEPES). Os tecidos foram pesados (\pm 50mg), depositados em tubos cônicos de vidro contendo 2mL de KOH 30% e submetidos à digestão em banho fervente durante 60 minutos. Para se obter a precipitação do glicogênio, foi adicionado, aos tubos, Na₂SO₄ saturado e álcool etílico (92%) e, posteriormente, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 2700 rpm. O conteúdo de glicogênio foi dosado como glicose após a hidrólise ácida (Geary et al., 1981) utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase (Kit Glicose ENZ-COLOR). A leitura das amostras foi realizada em um aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech), em comprimento de onda de 505nm. Os resultados foram expressos em gramas de glicogênio/100g de tecido úmido (g%).

Determinação da concentração de arginina e arginina fosfato

A determinação das concentrações de arginina e arginina fosfato foi realizada segundo o método descrito por Bergmeyer (1985). Após o sacrifício dos animais, os tecidos removidos foram colocados em placas de Petri contendo meio de solução fisiológica específico para *Neohelice granulata*. Esses tecidos foram pesados, colocados em tubos plásticos contendo ácido perclórico (1g tecido:2mL ácido perclórico) e água destilada gelada (3mL de H₂O:1mL de ácido perclórico) e essas soluções foram homogeneizadas em um homogeneizador Ultra Turrax. Para precipitar as proteínas o homogenado foi centrifugado a 30000g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante ácido foi neutralizado com KHCO₃. Uma segunda centrifugação foi realizada para remover o perclorato precipitado.

Do sobrenadante resultante, 0,05mL foram utilizados para o ensaio de determinação das concentrações de arginina. Além da amostra foram adicionados a uma cubeta: 0,20mL de solução tampão (fosfato 0,5mol/L, pH 7,0), 0,01mL de NADH, 0,05 de solução de piruvato e 0,680mL de água milli-Q. Esses reagentes foram misturados e foi feita uma primeira leitura da absorbância resultante (A_1). Então, foi adicionada à cubeta 0,01mL da solução da enzima octopina desidrogenase (ODH) e a leitura da absorbância foi feita a cada 5 min por 40 minutos (A_2) a fim de registrar o decaimento da reação. Para determinar a absorbância final (ΔA), A_2 foi diminuído de A_1 . Nesse método a arginina é reductivamente condensada com piruvato formando octopina, através da ação da enzima octopina desidrogenase (ODH). Essa reação específica é a base da medida da arginina e arginina fosfato pois o decréscimo na concentração de NADH, medida pela mudança na absorbância em 339nm (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech), é proporcional à quantidade de arginina.

Para a medição da arginina fosfato, uma hidrólise ácida precedeu uma segunda determinação de arginina na amostra. Nesse caso o ΔA representa a concentração de arginina mais a concentração de arginina fosfato em uma amostra diluída 1:5. Os resultados foram expressos como $\mu\text{moles/g}$ tecido.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Para a comparação entre os grupos controle, anoxia e recuperação foi utilizado ANOVA de uma via seguido de teste de Student-Newman-Keuls. O teste t de Student foi utilizado para a comparação entre os grupos HP e HC. Foi utilizado o programa SigmaStat 3.5 compatível com Windows.

RESULTADOS

Concentração de glicose na hemolinfa

Os caranguejos *Neohelice granulata*, tanto do grupo HP quanto do grupo HC, aumentaram significativamente ($p < 0,001$) a concentração de glicose hemolinfática quando submetidos à anoxia (Figura 4). No entanto, no período de recuperação pós-anoxia as duas dietas se comportaram de maneira distinta: os caranguejos HP diminuíram significativamente a glicemia, mas esta continuou mais alta ($p < 0,05$) que a observada no grupo controle ($p < 0,05$). Já na dieta HC também houve um decréscimo significativo na concentração de glicose na hemolinfa, no entanto, o valor foi menor que o do controle ($p < 0,001$).

A comparação das concentrações de glicose hemolinfática entre o grupo HP e HC mostra concentrações significativamente maiores no grupo HC (controle) (ANOVA g.l. 9; $F = 110,862$; $p < 0,001$) e nos caranguejos anoxia (ANOVA g.l. 9; $F = 103,795$; $p < 0,001$). No entanto, não houve diferença entre os grupos HP e HC no tratamento recuperação pós-anoxia.

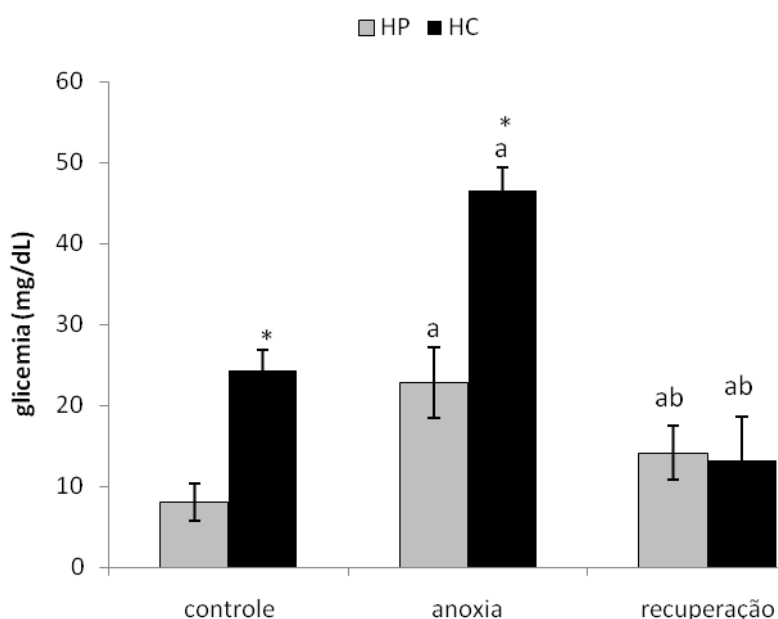


Figura 4: Glicose na hemolinfa de caranguejos alimentados com uma dieta HP ou HC. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. a – valores médios diferentes do grupo controle ($p < 0,05$). b – valores médios diferentes do grupo anoxia ($p < 0,05$). * - valores médios são significativamente diferentes do grupo HP ($p < 0,001$). ANOVA seguida de teste de Student-Newman-Keuls. O número amostral foi de 5 para a dieta HP e 5 para a dieta HC.

Concentração de glicogênio nos tecidos

No grupo controle, as concentrações de glicogênio no músculo da mandíbula de *N. granulata* foram significativamente maiores nos caranguejos alimentados com a dieta HC, quando comparadas àsquelas dos grupos: dieta HP (ANOVA g.l. 9; $F=9,558$; $p=0,015$), anoxia (ANOVA g.l. 8; $F=11,641$; $p=0,011$) e recuperação pós-anoxia (ANOVA g.l. 8; $F=99,804$; $p=0,001$) (Figura 5). No entanto, no músculo da mandíbula não foram constatadas diferenças entre os grupos controle, anoxia e recuperação pós-anoxia dentro de cada dieta.

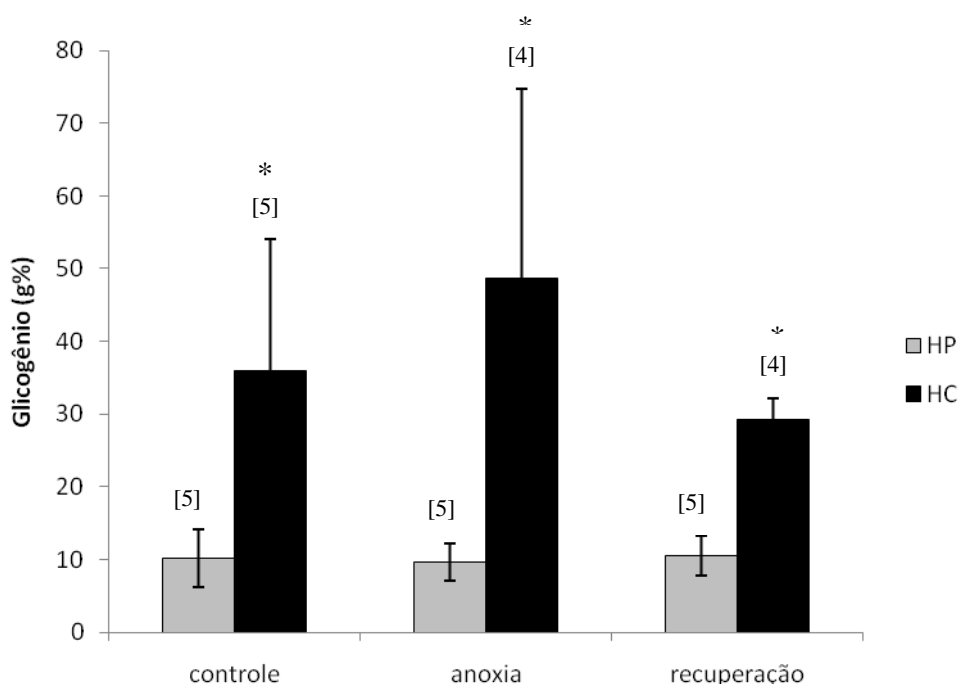


Figura 5: Concentração de glicogênio no músculo da mandíbula. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. O número amostral está indicado sobre as barras. * valores médios diferentes do grupo HP dentro de cada tratamento ($p<0,05$). ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls.

No hepatopâncreas (Figura 6), nas brânquias anteriores (Figura 7) e nas brânquias posteriores (Figura 8) de *N. granulata* não ocorreram diferenças significativas, em relação ao conteúdo de glicogênio, entre as dietas HP e HC em nenhum dos tratamentos: controle, anoxia e recuperação. Tão pouco houve significância entre os tratamentos controle, anoxia e recuperação dentro da dieta HP e dentro da dieta HC.

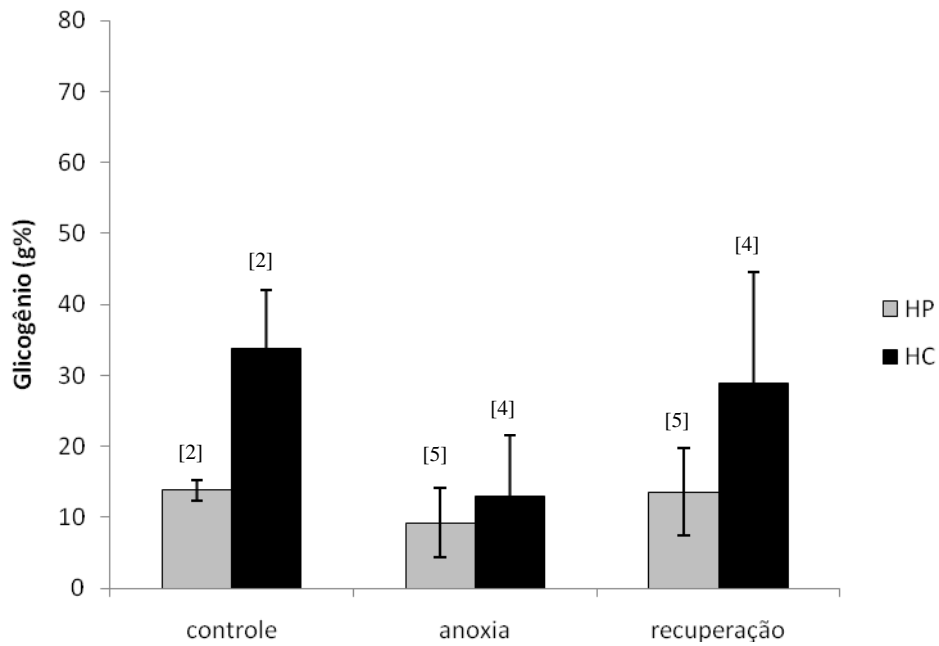


Figura 6: Concentração de glicogênio no hepatopâncreas. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. O número amostral está indicado sobre as barras. ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls.

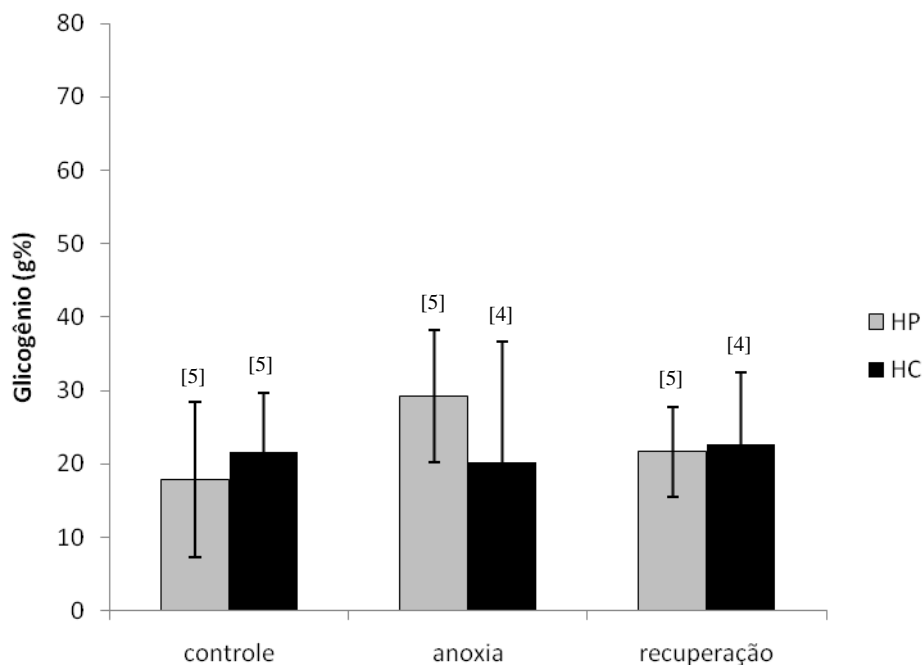


Figura 7: Concentração de glicogênio nas brânquias anteriores. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. O número amostral está indicado sobre as barras. ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls.

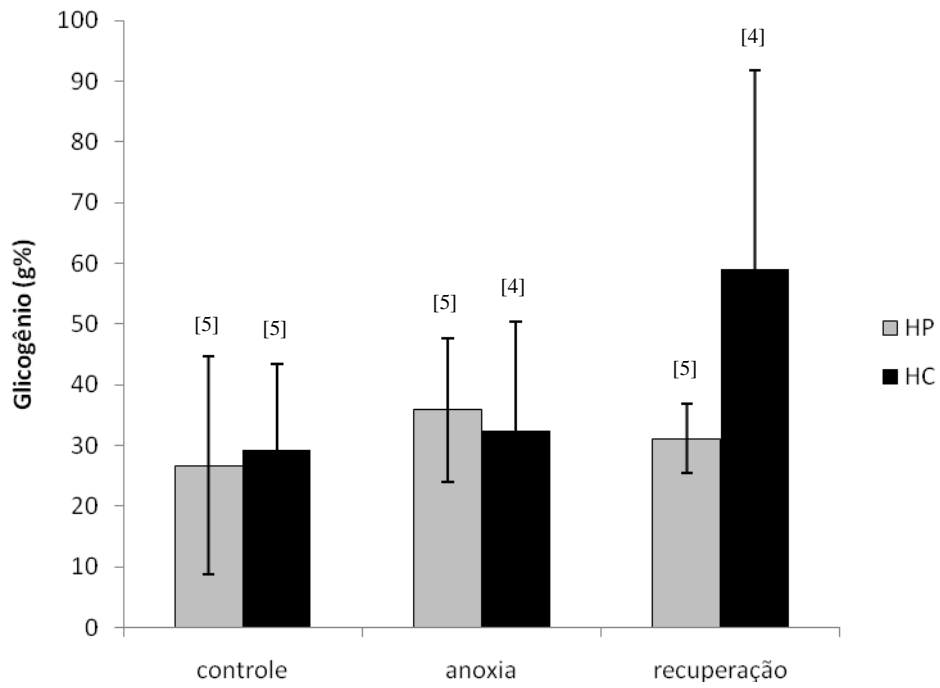


Figura 8: Concentração de glicogênio nas brânquias posteriores. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. O número amostral está indicado sobre as barras. ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls.

Concentração de arginina e arginina fosfato nos tecidos

Em relação à concentração de arginina e arginina fosfato, o tecido muscular de *N. granulata* mostrou um aumento significativo de ambos os substratos durante a anoxia, nos caranguejos alimentados com a dieta HP (ANOVA g.l. 14; $F=25,357$; $p<0,001$ e ANOVA g.l. 14; $F=42,186$; $p<0,001$, respectivamente). Esses valores decaíram cerca de 20% ($p>0,05$) durante a recuperação pós-anoxia, contudo, permaneceram elevados ($p<0,05$), quando comparados àqueles observados nos caranguejos controle (Figura 9).

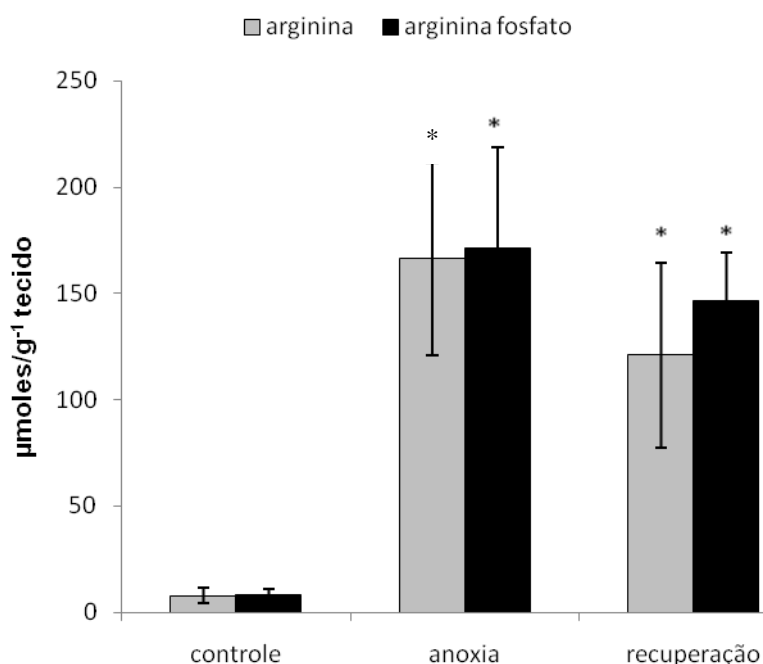


Figura 9: Concentração de arginina e arginina fosfato no músculo da mandíbula em caranguejos alimentados com a dieta HP. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. * valores médios diferentes do grupo controle ($p<0,05$). ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls. O número amostral foi de 5 para a dieta HP.

Por outro lado, caranguejos alimentados com a dieta HC não apresentaram diferenças significativas entre os três tratamentos tanto nas concentrações de arginina quanto de arginina fosfato do músculo da mandíbula (Figura 10). No entanto, no músculo mandibular a dieta HC causou concentrações de arginina e arginina fosfato significativamente menores que a dieta HP nos grupos anoxia (ANOVA g.l. 7; $F=34,874$; $p<0,05$ e ANOVA g.l. 7; $F=35,392$; $p<0,05$, respectivamente) e recuperação pós-anoxia (ANOVA g.l. 7; $F=19,560$; $p<0,05$ e ANOVA g.l. 7; $F=111,731$; $p<0,001$, respectivamente).

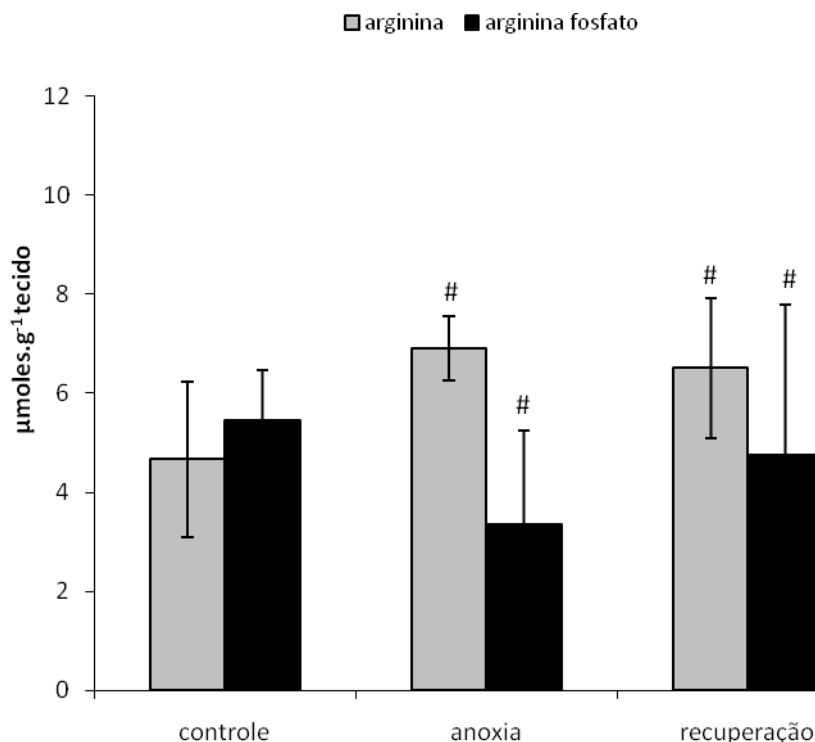


Figura 10: Concentração de arginina e arginina fosfato no músculo da mandíbula em caranguejos alimentados com a dieta HC. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. # valores médios diferentes do grupo HP ($p < 0,001$). ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls. O número amostral foi de 3 para a dieta HC.

O hepatopâncreas apresentou o mesmo comportamento que o músculo da mandíbula, com a diferença que as concentrações tanto de arginina quanto de arginina fosfato são muito maiores nesse tecido que no músculo. Caranguejos alimentados com a dieta HP aumentaram significativamente as concentrações de arginina e arginina fosfato no hepatopâncreas durante anoxia (ANOVA g.l. 14; $F=29,614$; $p < 0,001$ e ANOVA g.l. 14; $F=46,926$; $p < 0,001$, respectivamente) e esses valores seguiram significativamente elevados, em relação ao controle, durante a fase de recuperação pós-anoxia (Figura 11).

Os caranguejos alimentados com a dieta HC não apresentaram diferenças significativas no hepatopâncreas entre os três tratamentos tanto nas concentrações de arginina quanto de arginina fosfato (Figura 12). No entanto, as concentrações de arginina e arginina fosfato na dieta HC foram significativamente distintas da dieta HP nos grupos anoxia (ANOVA g.l. 7; $F=44,321$; $p < 0,001$ e ANOVA g.l. 7; $F=36,532$; $p < 0,001$, respectivamente) e recuperação pós-anoxia (ANOVA g.l. 6; $F=22,956$; $p < 0,05$ e ANOVA g.l. 7; $F=289,821$; $p < 0,001$) no hepatopâncreas.

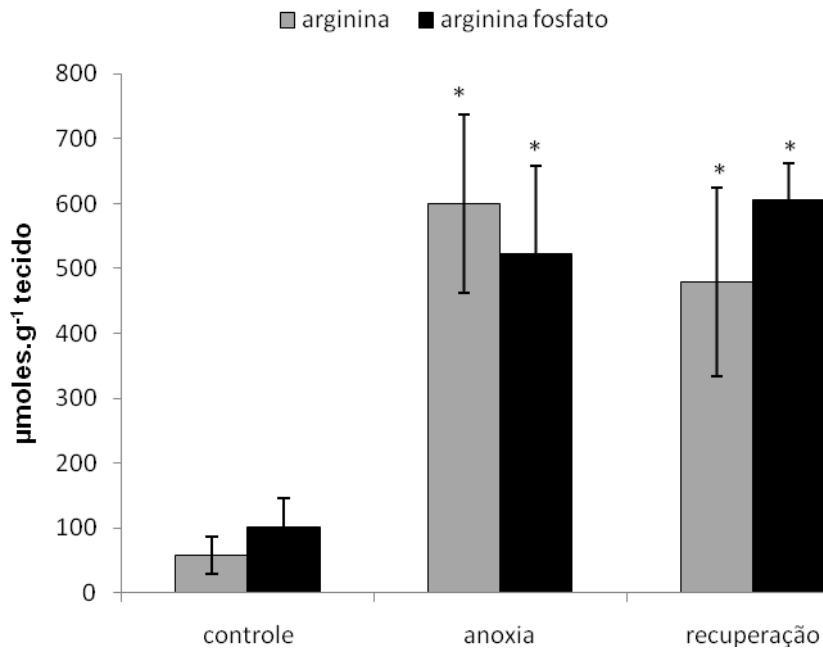


Figura 11: Concentração de arginina e arginina fosfato no hepatopâncreas em caranguejos alimentados com a dieta HP. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. * valores médios diferentes do grupo controle ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls. O número amostral foi de 5 para a dieta HP.

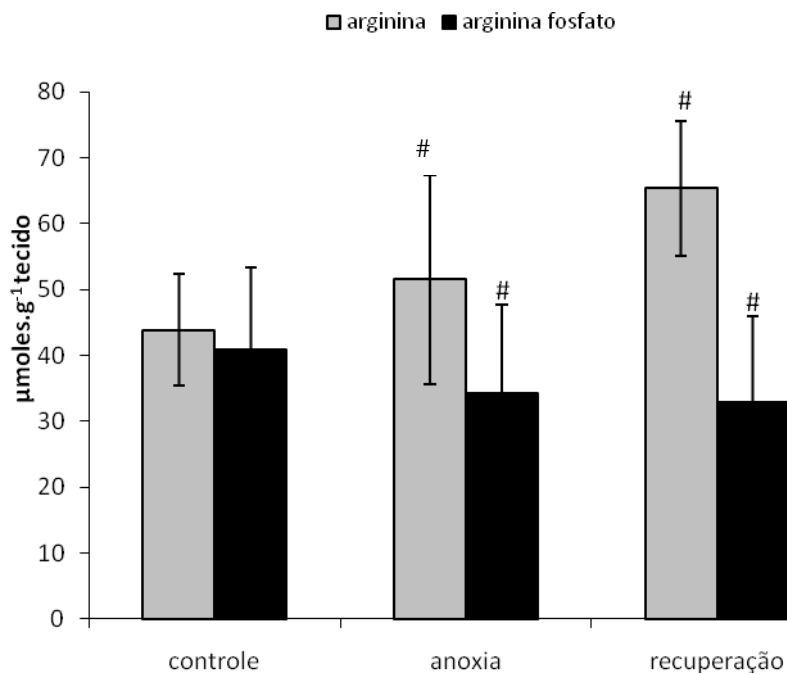


Figura 12: Concentração de arginina e arginina fosfato no hepatopâncreas em caranguejos alimentados com a dieta HC. As colunas e as barras verticais representam a média \pm desvio padrão da média. # valores médios diferentes do grupo HP ($p < 0,001$). ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls. O número amostral foi de 3 para a dieta HC.

Os tecidos das brânquias anteriores e posteriores de *N. granulata* não mostraram diferenças significativas nas concentrações de arginina e arginina fosfato nem em relação ao tratamento submetido (controle, anoxia, recuperação) nem em relação à composição da dieta (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito da anoxia e da recuperação pós-anoxia sobre as concentrações de arginina e arginina fosfato em brânquias anteriores e posteriores de caranguejos *N. granulata* alimentados com uma dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC). A concentração de arginina e arginina fosfato foi expressa em $\mu\text{moles.g}^{-1}$ de substrato por grama de tecido.

		Brânquias anteriores		Brânquias posteriores	
		Arginina ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)	Arginina fosfato ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)	Arginina ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)	Arginina fosfato ($\mu\text{moles.g}^{-1}$)
HP	Controle	6,295 \pm 1,60	22,714 \pm 11,18	3,547 \pm 0,63	13,573 \pm 2,84
	Anoxia	7,697 \pm 3,87	35,607 \pm 22,17	3,942 \pm 2,09	18,832 \pm 8,12
	Recuperação	3,399 \pm 1,06	38,525 \pm 25,11	2,529 \pm 1,44	14,354 \pm 9,78
HC	Controle	4,025 \pm 0,20	14,095 \pm 3,84	2,572 \pm 1,32	6,925 \pm 2,19
	Anoxia	4,521 \pm 0,99	14,949 \pm 3,91	2,197 \pm 0,31	6,985 \pm 1,54
	Recuperação	5,176 \pm 0,77	8,490 \pm 4,20	2,764 \pm 0,86	6,419 \pm 0,60

Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão da média. ANOVA seguido de teste de Student-Newman-Keuls. Não-significativo para todas as comparações. O número amostral foi de 5 para a dieta HP e 3 para a dieta HC.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Para diversos animais, como o *Neohelice granulata*, o acesso ao oxigênio ambiental é intermitente. Este caranguejo é semi-terrestre e habita as zonas meso e supra litorâneas de estuários da costa brasileira, onde suportam episódios diários de falta de oxigênio durante suas incursões terrestres ou quando permanecem em suas tocas durante os meses de inverno (Botto e Irigoyen, 1980; Turcato, 1990). Para sobreviverem a esses períodos de falta de oxigênio os caranguejos necessitam mobilizar suas reservas energéticas, cuja composição varia de acordo com a dieta. Análises do conteúdo estomacal desses animais concluíram que eles possuem hábito oportunista, pois no outono e no inverno foram encontradas maiores quantidades de vegetais, já na primavera foi encontrada maior frequência de itens de origem animal, e no verão houve equilíbrio entre os dois itens alimentares (D’Incao et al., 1990).

Estudos prévios em *N. granulata* demonstraram que o conteúdo de carboidratos e de proteínas das dietas administradas aos caranguejos induz diferentes ajustes metabólicos no hepatopâncreas, no músculo e nas brânquias em resposta à anoxia (Oliveira et al., 2001; Marqueze et al., 2006, Kirst, 2007). Os resultados do presente trabalho demonstram que as vias de metabolização da glicose e as vias alternativas de obtenção de ATP durante a anoxia e a fase de recuperação pós-anoxia são influenciadas pela dieta previamente administrada aos caranguejos.

Animais em normóxia alimentados com a dieta rica em carboidratos (HC) apresentaram valores significativamente maiores de glicemia que os caranguejos alimentados com a dieta rica em proteínas (HP). Na primeira hora de anoxia ambiental, tanto os animais alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) quanto àqueles mantidos com a dieta rica em carboidratos (HC) apresentaram um aumento na concentração de glicose hemolinfática de 2,8 e 1,9 vezes, respectivamente. Esse resultado sugere que a mobilização de glicose dos tecidos excede a sua utilização na via glicolítica, determinando acúmulo de glicose na hemolinfa. Outros trabalhos com crustáceos demonstraram que a exposição dos animais à hipóxia ou à anoxia ambiental provoca hiperglicemia (Van Aardt, 1988; Gonçalves, 1993; Anderson et al., 1994; Zou et al., 1996; Hervant et al., 1997; Kirst, 2007). O aumento da glicose hemolinfática é uma adaptação metabólica ao ambiente anóxico, e parece ser um tipo de preparação fisiológica para a demanda de fermentação do substrato quando as vias anaeróbias são utilizadas (Zou et al., 1996).

Após a anoxia, o período de recuperação é de grande importância funcional, pois é nele que as reservas energéticas são restauradas e os produtos finais são metabolizados ou removidos dos organismos. Nos caranguejos alimentados com a dieta HP e com a dieta HC, a glicose na

hemolinfa retorna a valores mais próximos daqueles verificados nos grupos controles após três horas de recuperação, no entanto esses valores continuam sendo significativamente distintos dos seus grupos normóxia. Em *N. granulata*, processos endergônicos de síntese são ativados durante a recuperação pós-anoxia, e os valores de síntese de glicogênio no músculo do grupo HP e no hepatopâncreas do grupo HC ultrapassam aqueles dos respectivos grupos controle (Ribarcki, 2007). Isso explica, em parte, a diminuição dos valores de glicose na hemolinfa durante o período de recuperação. Provavelmente, na recuperação pós-anoxia, a diminuição da concentração de glicose na hemolinfa nos grupos deve-se ao aumento da utilização de glicose por outros tecidos ou pelo gasto energético devido ao aumento da atividade locomotora do animal. Mesmo assim, três horas de recuperação pós-anoxia não foram suficientes para que a glicemia hemolinfática retornasse aos valores controle.

Os tecidos tiveram respostas distintas frente à anoxia quando analisadas as concentrações de glicogênio. O músculo da mandíbula de caranguejos alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) demonstrou ter concentrações menores de glicogênio que o músculo de animais alimentados com a dieta rica em carboidratos (HC), tanto em *N. granulata* controle quanto em caranguejos submetidos à anoxia e à recuperação pós-anoxia. Uma diferença significativa na concentração de glicogênio entre caranguejos HP e HC também foi encontrada por Marqueze et al. (2006). Nos animais controles alimentados com a dieta HP a oxidação de glicose seria uma importante via de geração de energia, justificando, em parte, a menor concentração de glicogênio verificada no músculo de caranguejos alimentados com essa dieta. Além disso, a significativa capacidade de síntese de lipídios a partir de glicose, verificada no músculo de *N. granulata* alimentados com a dieta HP (Ribarcki, 2007), sugere que a glicose no músculo do grupo HP também estaria sendo desviada para a síntese de lipídios. Esta hipótese seria confirmada, em parte, pela constatação que o músculo de caranguejos dos grupos HP apresenta capacidade de síntese de glicogênio a partir de glicose similar àquela verificada no músculo do grupo HC.

Os resultados mostram que uma hora de anoxia não alterou significativamente as concentrações de glicogênio tanto no músculo da mandíbula quanto no hepatopâncreas e nas brânquias. Uma hora de anoxia também não alterou a captação de glicose e a síntese de glicogênio no músculo e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentados tanto com a dieta HP quanto com a dieta HC (Ribarcki, 2007). Oliveira et al. (2001), estudando o efeito de diferentes tempos de anoxia em *N. granulata* mantidos com a dieta HP ou com a dieta HC, verificaram que a redução na capacidade de síntese de glicogênio ocorreu somente após 2 horas de anoxia em ambos os grupos.

Lutz e Storey (1997) sugerem que vertebrados e invertebrados apresentam uma resposta bifásica à redução da concentração de O₂ ambiental. A primeira fase conduziria à ativação da via glicolítica para manter ou aumentar a produção de ATP, já que as vias de produção dependentes de O₂ estariam significativamente reduzidas. A segunda fase levaria à redução da taxa metabólica, o que possibilitaria o uso gradual das reservas endógenas e a sobrevivência por períodos prolongados de hipóxia severa ou anoxia (Guppy et al., 1994; Churchill e Storey, 1989).

Portanto, os resultados sugerem que, após uma hora em anoxia, o *Neohelice granulata* ainda não está em depressão metabólica. No músculo e no hepatopâncreas desta espécie, a enzima piruvato quinase aumenta a atividade significativamente após uma hora de anoxia em caranguejos alimentados com a dieta HP, sugerindo um aumento da atividade glicolítica; contudo, após duas horas em anoxia ocorre uma diminuição na atividade da via glicolítica muscular (Marqueze, 2004; Marqueze et al., 2006). Também a anoxia por uma hora não alterou a captação de glicose no hepatopâncreas e no músculo de caranguejos alimentados com a dieta HP e HC, explicando assim a manutenção da capacidade de síntese de glicogênio e a atividade glicolítica (Marqueze, 2004; Marqueze et al., 2006) e os valores de glicose hemolinfática mais moderados do que aqueles obtidos por Oliveira et al. (2001) em *N. granulata* após quatro horas de anoxia. No caranguejo *Neohelice granulata*, Santos et al. (1987) constataram uma redução do consumo de oxigênio e da atividade de locomoção após duas horas de exposição à hipóxia ambiental, o que caracterizaria o início da depressão metabólica.

O hepatopâncreas não apresentou diferenças na concentração de glicogênio entre caranguejos alimentados com a dieta HP e a HC e os tratamentos também não causaram nenhuma modificação significativa neste tecido. No entanto, no grupo controle tanto de caranguejos HP quanto de caranguejos HC o número amostral foi igual a dois, devido a perdas de tecidos. Mais experimentos são necessários para aumentar o número amostral porque, possivelmente, serão encontradas diferenças significativas nas concentrações de glicogênio entre o grupo HP e HC no hepatopâncreas de caranguejos controle e, dentro do grupo HC, haverá diferenças entre o grupo controle e o grupo anoxia. No hepatopâncreas de *N. granulata* Oliveira et al. (2001) verificaram diminuição na captação de glicose e na síntese e mobilização de glicogênio somente após duas horas em anoxia, demonstrando que uma hora de anoxia talvez não seja suficiente para provocar alterações nas reservas de glicogênio no hepatopâncreas. Oliveira et al. (2001) também sugerem que, em hepatopâncreas de *N. granulata* mantidos com a dieta HP e submetidos à recuperação de doze horas após oito horas de anoxia, o aumento da captação de glicose ocorre nas primeiras horas da recuperação. Eles constataram somente às

doze horas de recuperação um aumento significativo na síntese de glicogênio no hepatopâncreas dos caranguejos alimentados com a dieta HP.

As brânquias, tanto anteriores quanto posteriores, não diferiram significativamente na concentração de glicogênio em relação à dieta administrada e ao tratamento ao qual o caranguejo foi submetido, estes resultados concordam com os achados de Vinagre e Da Silva (1992). A anoxia por uma hora também não afetou a capacidade de captação de glicose e de síntese e mobilização de glicogênio em ambas as brânquias do grupo HP e HC (Kirst, 2007). No entanto, as brânquias posteriores mostraram uma tendência a aumentar sua concentração de glicogênio durante a recuperação em caranguejos alimentados com a dieta HC. Em *Neohelice granulata* submetidos à anoxia por diferentes períodos experimentais ocorre um aumento marcante nos níveis de lactato na hemolinfa (Oliveira et al., 2004a; Marqueze, 2004). Em *N. granulata* as brânquias anteriores e posteriores possuem capacidade gliconeogênica a partir de aminoácidos e de glicerol (Chittó, 2005; Chittó et al, 2009). Assim, durante a fase de recuperação pós-anoxia neste trabalho, o aumento nas concentrações de glicogênio nas brânquias posteriores do grupo HC, provavelmente seja via gliconeogênese a partir de lactato, pois os níveis desse metabólito diminuem durante a recuperação (Oliveira et al., 2004a). O mesmo perfil não foi observado nas brânquias anteriores. Talvez, isso ocorra devido à diferença funcional e estrutural entre as brânquias anteriores e posteriores, pois as primeiras apresentam um epitélio do tipo respiratório e nas segundas a atividade osmorreguladora é predominante (Genovese et al., 2000; Luquet et al., 2002). Logo, em situações de anoxia, as brânquias posteriores possuiriam um maior gasto energético.

Em comparação com outros invertebrados, altas reservas de arginina fosfato foram encontradas no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas de *Neohelice granulata*. Essa característica, juntamente com os altos níveis de glicogênio encontrados nessa espécie, podem explicar parcialmente a alta resistência de *Neohelice granulata* aos baixos níveis de oxigênio das tocas. Hervant et al. (1995, 1996, 1997) mostraram que o isópode subterrâneo *Stenasellus virei* possui quantidades mais elevadas de arginina fosfato e glicogênio estocados que os crustáceos epígenos *Gammarus fossarum* e *Asellus aquaticus*. De acordo com esses autores, o estoque de grandes quantidades de arginina fosfato e glicogênio é a característica mais adaptativa para espécies aquáticas subterrâneas.

Em animais em normóxia, a concentração de arginina e arginina fosfato não sofreu influência da dieta: tanto o músculo da mandíbula quanto o hepatopâncreas não mostraram diferenças significativas entre caranguejos alimentados com a dieta HP e caranguejos alimentados com a dieta HC. No entanto, em normóxia, os valores de ATP no músculo e no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com a dieta HP são significativamente menores que

àqueles verificados no grupo HC (Marqueze, 2004; Marqueze et al., 2006). Além disso, já foi constatada uma elevada conversão de ^{14}C -glicose em $^{14}\text{CO}_2$ no músculo e no hepatopâncreas de caranguejos HP em relação ao grupo HC (Ribarcki, 2007). Essa maior oxidação de glicose no músculo e no hepatopâncreas de animais alimentados com a dieta rica em proteínas (HP), talvez ocorra para compensar as reservas de carboidratos bastante reduzidas neste caranguejo (Kucharski e Da Silva, 1991). Logo, as reservas de arginina e arginina fosfato não estariam sendo necessárias em animais em normóxia.

Por outro lado, após uma hora em anoxia os valores de arginina fosfato no músculo e no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com a dieta rica em proteínas foi significativamente maior (171,20 $\mu\text{moles/g}$ e 522,33 $\mu\text{moles/g}$, respectivamente) do que naqueles alimentados com a dieta rica em carboidratos (3,36 $\mu\text{moles/g}$ e 34,31 $\mu\text{moles/g}$, respectivamente). O fato de caranguejos alimentados com a dieta HP possuírem níveis mais elevados de arginina fosfato em anoxia pode estar ocorrendo devido à maior ingestão de aminoácidos, entre eles a arginina, que esses animais apresentam em relação aos caranguejos alimentados com a dieta HC. Assim, quando uma situação de estresse, como anoxia, ocorre, animais alimentados com proteínas são capazes de mobilizar seus estoques de arginina e fosfatá-los para produzir energia. Além disso, os caranguejos alimentados com carboidratos possuem maior capacidade de sintetizar e estocar substratos originados da glicose, como o glicogênio. Portanto, nesses animais a reserva de arginina fosfato não é tão essencial quanto em caranguejos alimentados com proteínas, que possuem níveis marcadamente menores de glicogênio (Marqueze et al., 2006).

Após uma hora em anoxia, Marqueze et al. (2006) observaram que, em caranguejos alimentados com a dieta rica em carboidratos (HC), a atividade da enzima piruvato quinase (PK) e o conteúdo de glicogênio diminuíram (Marqueze et al., 2006). No presente trabalho, o músculo da mandíbula e o hepatopâncreas de animais alimentados com a dieta HC não mostraram diferenças significativas nas concentrações de arginina e arginina fosfato após uma hora em anoxia. Esses resultados sugerem que em animais HC a ativação da glicólise ocorre antes da primeira hora de anoxia; após uma hora sem oxigênio o fluxo glicolítico pode decair. Considerando ainda que o músculo da mandíbula de *N. granulata* possui capacidade gliconeogênica (Schein et al., 2004), o decréscimo na atividade da PK durante a primeira hora em anoxia em animais alimentados com a dieta HC pode sugerir um aumento na atividade gliconeogênica. Portanto, os animais alimentados com a dieta rica em carboidratos não mobilizaram suas reservas de arginina e arginina fosfato durante o período de privação de oxigênio.

Por outro lado, caranguejos alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) mostraram um acréscimo significativo tanto das concentrações de arginina quanto das de arginina fosfato

no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas após uma hora em anoxia. Durante esse mesmo período experimental, um aumento na atividade da enzima piruvato quinase (PK) e uma redução na concentração de glicogênio no músculo de *N. granulata*, alimentados com a dieta rica em proteínas (HP), foram observados por Marqueze et al. (2006). Além disso, em contraste aos animais alimentados com a dieta HC, o músculo da mandíbula de caranguejos alimentados com a dieta HP apresentou um aumento da concentração de ATP após uma hora em anoxia (Marqueze et al., 2006).

O uso preferencial de reservas de fosfagênio, como a arginina fosfato, com o objetivo de manter altas concentrações de ATP no tecido muscular durante a primeira hora de anoxia, já foi observado em crustáceos e moluscos (Gäde, 1983; Hervant et al., 1995; Hervant, 1996) e pode explicar o aumento do conteúdo de ATP encontrado em caranguejos alimentados com a dieta rica em proteínas após uma hora em anoxia. Considerando que durante a anoxia os organismos precisam aumentar a produção de energia em um primeiro momento e após diminuir a atividade dos processos que consomem energia (Lutz e Nilsson, 1997; Nilsson, 2001), o presente trabalho demonstra que no primeiro momento o animal está aumentando as reservas de arginina e arginina fosfato para serem usadas posteriormente, caso a anoxia prosseguir por mais tempo.

Na recuperação pós-anoxia, os caranguejos reativam sua atividade de locomoção e aumentam seu gasto de energia. No entanto, não foram observados decréscimos significativos nas concentrações de arginina fosfato do músculo e do hepatopâncreas tanto na dieta HP quando na dieta HC durante esse período. Após três horas de recuperação pós-anoxia o conteúdo de ATP no músculo da mandíbula decaiu em ambas as dietas (Marqueze et al., 2006). Além disso, no hepatopâncreas de caranguejos alimentados com a dieta HP, um aumento na captação de glicose e na síntese de glicogênio foi observado durante o período de recuperação pós anoxia (Oliveira et al., 2001). Portanto, mais experimentos com tempos maiores de recuperação serão necessários para determinar se os valores fosfagênio retornam aos valores de normóxia.

Não foram encontradas diferenças significativas nas reservas de arginina e arginina fosfato de brânquias anteriores e posteriores de caranguejos submetidos à anoxia e a fase de recuperação da anoxia em ambas as dietas. Estes resultados sugerem que nas brânquias, ao contrário do hepatopâncreas e do músculo, a resposta ao estresse anóxico não envolve um aumento nas reservas de fosfagênios. Nesse tecido, as reservas de fosfagênio não teriam a importância que possuem no hepatopâncreas e no músculo, onde as concentrações deste substrato, em todos os grupos experimentais estudados, foram significativamente maiores que nas brânquias. Sabe-se que a arginina, o aminoácido precursor da arginina fosfato, está envolvido em várias vias e reações metabólicas essenciais e é encontrada principalmente em

tecidos musculares e no fígado (Bergmeyer, 1985; Hill et al., 1991; Speed et al., 2001; Morris e Adamczewska, 2002).

No presente trabalho, o caranguejo *Neohelice granulata* mostrou mudanças significativas na glicose hemolinfática e nas concentrações de glicogênio e de arginina fosfato no tecido muscular e hepatopancreático sob condições de anoxia. Outros trabalhos já mostraram diferenças na atividade glicolítica, na produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicose e de ^{14}C -lactato, na síntese e mobilização de glicogênio, na síntese de lipídios e nas concentrações de glicose livre e ATP nessa espécie frente a desafios de anoxia e recuperação pós-anoxia (Marqueze et al., 2006; Kirst, 2007; Ribarcki, 2007). Esses processos e metabólitos são importantes reservas para os períodos hipóxicos e em seu hábitat o caranguejo *Neohelice granulata* enfrenta condições de hipóxia e de anoxia diariamente. Essas observações, associadas com a alta eficiência do metabolismo anaeróbico, podem explicar parcialmente como *N. granulata* tolera os baixos níveis de oxigênio em seu hábitat. Além disso, o trabalho mostrou que a composição da dieta administrada durante quinze dias aos caranguejos modifica o fluxo de glicose e a concentração de arginina fosfato, alterando assim o padrão de resposta metabólica ao estresse anóxico e à fase de recuperação pós-anoxia. Além disso, os resultados demonstram que esta resposta é tecido-específica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; HIRAI, S.; OKADA, S. Metabolic responses and arginine kinase expression under hypoxic stress of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. **Comp Biochem Physiol**, v. 146A, p. 40-46, 2007.

ADAMCZEWSKA, A. M.; MORRIS, S. Ecology and behavior of *Gecarcoidea natalis*, the Christmas Island red crab, during the annual breeding migration. **Biol Bull**, v. 200, p. 305-320, 2001.

ANDERSON, S. J.; TAYLOR, A. C.; ATKINSON, J. A. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassanidea). **Comp Biochem Physiol**, v. 108A, p. 515-522, 1994.

BEIS, L.; NEWSSHOLME, E.A. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. **Biocem J**, v. 152, p. 23-32, 1975.

BERGMEYER, H. U. **Methods of enzymatic analysis. Metabolites 3: lipids, amino acids and related compounds**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1985.

BOND-BUCKUP, G.; FONTOURA, N.F.; MARRONI, N.P., KUCHARSKI, L.C.R. **O caranguejo**: manual para o ensino prático em zoologia. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1991.

BOTTO, J. L.; IRYGOYEN, H. P. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del río Salado, provincia de Buenos Aires. In: **Seminario Latinoamericano en Ecología Bentónica y Sedimentología de La Plataforma Continental de Atlántico Sur**, UNESCO, Montevideo, Uruguay, 161-169, 1980.

BRIDGES, C. R.; BRAND, A. R. The effect of hypoxia on oxygen consumption and blood lactate levels of marine crustacea. **Comp Biochem Physiol**, v. 65A, p. 399-409, 1980.

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

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

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. **Invertebrate Biology**, v. 128, p. 261–268, 2009.

- CHURCHILL, T. A.; STOREY, K. B. Intermediary energy metabolism during dormancy and anoxia in the land snail *Otala lactea*. **Physiol Zool**, v. 62(5), p. 1015-1030, 1989.
- COOPER, A.W. Salt Marches. In: ODUM, H.; COPELAND, B.J.; MACMAHAN, E. A. (eds) **Coastal Ecological Systems of United States**, vol. II, Washington D.C.: The Conservation Foundation, p. 55-98, 1974.
- CORSSMITH, E. P. M.; ROMIJN, J. A.; SAWERWEIN, H. P. Regulation of glucose production with special attention to non-classical regulatory mechanisms: a review. **Metab Clin Exp**, v. 50, p. 742-755, 2001.
- DA SILVA-CASTIGLIONI, D.; OLIVEIRA, G. T.; BUCKUP, L. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia. **Comp Biochem Physiol**, v. 156^a, p. 436-444, 2010.
- D'INCAO, F.; RUFFINO, M. L.; SILVA, K.G. Notas preliminares sobre a ecologia de *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) na Barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Resumos XV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Curitiba, 1988.
- D'INCAO, F.; RUFFINO, M. L.; SILVA, K.G.; BRAGA, A. C. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) na barra de Rio Grande, RS. **Atlantida**, v. 12 (2), p. 85-93, 1990.
- DRACH, F.; TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu**, v. 161, p. 595-607, 1967.
- ENGLAND, W. R.; BALDWIN, J. Anaerobic energy metabolism in the tail musculature of the Australian yabby *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): role of phosphagens and anaerobic glycolysis during escape behavior. **Physiol Zool**, v. 56, p. 614-622, 1983.
- GÄDE, G. Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. **J Exp Zool**, v. 228, p. 415-429, 1983.
- GEARY, N.; LANGHANS, W.; SCHARRER, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression os feeding in the rat. **Am J Physiol**, v. 241, n. 10, p. R330-335, 1981.
- GENOVESE, G.; LUQUET, C. M.; PAZ, D. A.; ROSA, G. A.; PELLERANO, G. N. The morphometric in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* under hyper-and hyporegulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. **J Anat**, v. 197, p. 239-246, 2000.
- GONÇALVES, A. A. **Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* Dana: 1851 (Crustacea: Decapoda: Grapsidae) durante anoxia ambiental**. Monografia (Graduação em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 1983.
- GUPPY, M.; FUERRY, C. J.; FLANING, J. E. Biochemical principles of metabolic depression. **Comp Biochem Physiol**, v. 109B, p. 175-189, 1994.
- HABOLD, C.; FOLTZER-JOURDAINNE, C.; LE MAHO, Y.; LIGNOT, J.; OUDART, H. Intestinal gluconeogenesis and glucose transport according to body fuel availability in rats. **J Physiol**, v. 566, p. 575-586, 2005.
- HANSON, R. W.; RESHEF, L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. **Annu Rev Biochem**, v. 66, p. 581-611, 1997.

- HARTNOL, R. G. Evolution, systematic and geographical distribution. In: BURGGREN, W.; MACMAHON, B. (eds) **Biology of land crabs**. New York: Cambridge University Press, p. 6-54, 1988.
- HENRY, R. P.; BOOTH, C. E.; LALLIER, F. H.; WALSH, P. J. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapods crustaceans. **J Exp Biol**, v. 186, p. 215-234, 1994.
- HERVANT, F.; MATHIEU, J.; GARIN, D.; FRÉMINET, A. Behavioral, ventilatory and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigeal *Gammarus fossarum* (Crustacea: Amphipoda). **Physiol Zool**, v. 68, p. 223-244, 1995.
- HERVANT, F. The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hypogean and epigeal crustaceans. **C R Acad Sci Paris (Série III)**, v. 319, p. 1071-1077, 1996.
- HERVANT, F.; MATHIEU, J.; MESSANA, G. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. **C R Acad Sci Paris**, v. 320, p. 139-148, 1997.
- HERVANT, F.; MATHIEU, J.; BARRE, H. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding. **J Exp Biology**, v. 202, p. 3587-3595, 1999a.
- HERVANT, F.; GARIN, D.; MATHIEU, J.; FRÉMINET, A. Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. **J Exp Biol**, v. 202, p. 579-592, 1999b.
- HILL, A.D.; TAYLOR, A.C.; STRANG, R.H.C. Physiological and metabolic responses of shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 150, p. 31-50, 1991.
- HOCHACHKA, P. W. **Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance**. Cambridge: Harvard University Press, 1980.
- HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. **Biochemical Adaptation**. New Jersey: Princeton University Press, 1984.
- HOLMAN, J. D.; HAND, S. C. Metabolic depression is delayed and mitochondrial impairment averted during prolonged anoxia in the ghost shrimp, *Lepidophthalmus louisianensis* (Schmitt, 1935). **J Exp Mar Biol Ecol**, v. 376, p. 85-93, 2009.
- JOHNSTON, M. A.; DAVIES, P. S. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp Biochem Physiol**, v. 41B, p. 433-443, 1973.
- KIRST, I. B. **Efeito da anoxia e da recuperação sobre o metabolismo de carboidratos em brânquias de *Chasmagnathus granulata* alimentados com uma dieta rica em proteínas ou carboidratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- KUCHARSKI, L.C.R.; DA SILVA, R.S.M. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp Biochem Physiol**, v. 99A, p. 215 – 218, 1991a.

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

KUCHARSKI, L.C.R. **Insulina: presença de receptores e efeito biológico em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

LALLIER, F. H.; WALSH, P. J. Metabolic potential in tissue of blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bull Mar Sci**, v. 48, p. 665-669, 1991.

LANG, F.; BUSCH, G. K. L.; RITTER, M.; VOLKL, H.; WAEDEGGER, S.; GULBINS, E.; HAUSSONGER, D. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. **Physiol Review**, v. 78, p. 247, 1998.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 2006.

LORET, S. M.; VAN DER GOOR, N.; DEVOS, P. E. Susoensions d'hemocytess pour létude *in vitro* de la charge em glucose chez um Crustacé Décapodé. **Oceanis**, v. 15, p. 419-431, 1989.

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

LUTZ, P. L. Mechanisms for anoxic survival in the vertebrate brain. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 601-618, 1992.

LUTZ, P. L.; NILSSON, G. E. Contrasting strategies for anoxic brain survival – Glycolysis up or down. **J Exp Biol**, v. 200, p. 411-419, 1997.

LUTZ, P. L.; STOREY, K. B. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In: DANTZLER, W. H. (ed.) **Handbook of Physiology**, vol. II, section 13: Comparative Physiology, Oxford: American Physiological Society, p. 1479–1522, 1997.

LYNCH, M. P.; WEEB, K. L. Variations in serum constituents of the blue crab *Callinectes sapidus*: total serum protein. **Comp Biochem Physiol**, v. 44A, p. 1237-1249, 1973.

MARQUEZE, A. **Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *Chasmagnathus granulatus* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MARQUEZE, A.; KUCHARSKI, L. C. R.; DA SILVA, R. S. M. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. **J Exp Mar Biol Ecol**, v.332, p. 198-205, 2006.

MAÑE-GAZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B. H.; LEYMONTE, J. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851: I osmorregulación frente a cambios de salinidad. **Physis Secc**, v. A33, p. 163-171, 1974.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry**. Baltimore: R.R. Donneley & Sons, 1996.

MITHIEUX, G.; RAJAS, F.; GAUTIER-STEIN, A. A novel role for glucose-6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. **J Biol Chem**, v. 279, p. 44231-44234, 2004.

MOON, T. W. Adaptation, constraint, and the function of the glyconeogenic pathway. **Can J Zool**, v. 66, p. 1059-1068, 1988.

MORRIS, S.; ADAMCZEWSKA, A. Utilization of glycogen, ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs *Gecardoidea natalis*. **Comp Biochem Physiol**, v. 133A, p. 813-825, 2002.

MUNDAY, K. A.; POAT, P. C. Respiration and energy metabolism in crustacean. In: FLORKIMN, M.; SCHEERM, B. T. (eds) **Chemical Zoology**. New York: Academic Press, p. 191-211, 1971.

NEWSHOME, E. A.; LEECH, A. R. **Biochemistry for the medical sciences**. New York: John Wiley & Sons, 1983.

NILSSON, G. E. Surviving anoxia with the brain turned on. **News Physiol Sci**, v. 16, p. 217-221, 2001.

ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1985.

OLIVEIRA, G. T.; DA SILVA, R. S. M. Gluconeogenesis in the hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp Biochem Physiol**, v. 118A, n. 4, p. 1429-1435, 1997.

OLIVEIRA, G. T.; DA SILVA, R. S. M. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp Biochem Physiol**, v. 127B, p. 375-381, 2000.

OLIVEIRA, G. T.; ROSSI, I. C.; DA SILVA, R. S. M. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Mar Biol**, v. 139, p. 335-342, 2001.

OLIVEIRA, G. T.; EICHELER, P.; ROSSI, I. C.; DA SILVA, R. S. M. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **J Exp Zool**, v. 301A, p. 240-248, 2004a.

OLIVEIRA, G. T.; ROSSI, I. C.; KUCHARSKI, L. C. R.; DA SILVA, R. S. M. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting crabs previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp Biochem Physiol**, v. 137A, p. 383-390, 2004b.

QUILLARD, M.; RENOULF, S.; HUSSON, A.; MEISSE, D.; LAVOINNE, A. Glutamine and regulation of gene expression in mammalian cells. Special reference to phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). **Biochimia**, v. 79, p. 125-128, 1997.

RANDALL, D., BURGGREN, W., FRENCH, K. **Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações**. Rio de Janeiro: Ed. Guabara Koogan S.A., 2000.

RIBARCKI, F. B. **Efeito da anoxia e da recuperação sobre o metabolismo de carboidratos em *Chasmagnathus granulatus* alimentados com dieta rica em proteínas ou rica em carboidratos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

- SANTOS, E. A.; BALDISSEROTO, B.; BIANCHINI, A.; COLARES, E.P.; NERY, L. E. M.; MANZONI, G. C. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata*, Dana 1851. **Comp Biochem Physiol**, v. 88A, p. 21-25, 1987.
- SANTOS, E. A.; NERY, L. E. M.; MANZONI, G. C. Action of the crustacean hyperglycemic hormone of the *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). **Comp Biochem Physiol**, v. 89A, p. 329-332, 1988.
- SCHEIN, V.; WACHÉ, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L. C. R.; VAN WORHOUDT, A.; DA SILVA, R. S. M. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters**, v. 561, p. 202-206, 2004.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. São Paulo: Santos, 2002.
- SCHMITT, A. S. C.; SANTOS, E. A. Lipid and carbohydrate metabolism of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda) during immersion. **Comp Biochem Physiol**, v. 106A, p. 329-336, 1993.
- SEDLMEIER, D. Mode action of the crustacean hyperglycemic hormone. **Amer Zool**, v. 25, p. 223-232, 1985.
- SPEED, S.R.; BALDWIN, J.; WONG, R.J.; WELLS, R.M.G. Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster *Jasus edwardsii* and responses to emersion during simulated live transport. **Comp Biochem Physiol**, v. 128 B, p. 435-444, 2001.
- TIELENS, A. G.; VAN DE PAS, F. A.; VAN DEN HEUVEL, J. M.; VAN DEN BERGH, S. G. The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. **Mol Biochem Parasitol**, v. 46(1), p. 181-184, 1991.
- THABREW, M. I.; POAT, P. C.; MUNDAY, K. A. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp Biochem Physiol**, v. 40B, p. 531-541, 1971.
- THOMPSON, R. K.; PRITCHARD, A. W. Respiratory adaptations of the two burrowing crustaceans *Callinassa californiensis* e *Upogebia pugettensis*. **Biol Bull**, v. 136, p. 274-287, 1969.
- TURCATO, G. S. **Estudo biológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil**. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- URICH, K. **Comparative Animal Biochemistry**. New York: Springer-Verlag, 1994.
- VAN AARDT, W. J. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. **Comp Biochem Physiol**, v. 91A, p. 299-304, 1988.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt Biochem**, v. 11, p. 245-265, 1965.
- VINAGRE, A. S.; DA SILVA, R. S. M. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp Biochem Physiol**, v. 102, p. 579-583, 1992.

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

WEINSTEIN, R. B.; FULL, R. J. Performance limits of low temperature, continuous locomotion are exceeded when locomotion is intermittent in the ghost crab. **Physiol Zool**, v. 71, p. 274-284, 1998.

WÜRDIG, N.L. **Ostracodes do sistema lagunar de Tramandaí, RS, Brasil, sistemática, ecologia e subsídios à paleoecologia**. Tese (Doutorado em Paleontologia) – Curso de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

ZAMMIT, V. A.; NEWSHOLME, E. A. The maximum activities of hexokinase phosphorilase, phosphofrutokinase, glycerol phosphate dehydrogenases, lactate dehydrogenase, octopine dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, nucleoside diphosphatekinase, glutamate-oxaloacetato transaminase and arginine kinase in reelatio to carbohydrate utilization in muscles from marine invertebrates. **Biochem J**, v. 160, p. 447-462, 1976.

ZOU, E.; DU, N.; LAI, W. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of the Chinese freshwater crab *Erioccheir sinensis* (Crustacea, Decapoda). **Comp Biochem Physiol**, v. 114A, p. 105-109, 1996.