



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

**EFEITO DA COMPOSIÇÃO DA DIETA SOBRE O METABOLISMO DO LACTATO  
NO MÚSCULO DO CARANGUEJO *Chasmagnatus granulatus* SUBMETIDO A HIPÓXIA  
E A RECUPERAÇÃO DA HIPÓXIA**

Tese de Doutorado

ALUNO: JOSÉ EDUARDO SALAZAR MACIEL

ORIENTADORA: ROSELIS SILVEIRA MARTINS DA SILVA

Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor

Porto Alegre, 2007

Dedico este trabalho à minha família

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Professora Roselis Silveira Martins da Silva, pela acolhida em sua equipe, pelos ensinamentos, auxílio durante os experimentos, pela paciência e pela amizade.

Ao professor Luis Carlos Rios Kucharski, pela presença constante, auxílio indispensável em todo o tipo de situação envolvidas no laboratório, desde material de trabalho até orientações fundamentais para o projeto e minha formação.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos e auxílio financeiro viabilizando este projeto.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, responsável pela minha formação profissional.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia Comparada, pelos ensinamentos nos primeiros experimentos, pelos auxílios em tantos outros e sobretudo pela amizade desenvolvida neste período.

Aos professores do curso de Pós-Graduação pelos conhecimentos transmitidos, fundamentais para a formação dos alunos.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pelo carinho e constante boa vontade no atendimento as necessidades dos alunos.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes tempos de hipóxia ambiental e da recuperação da hipóxia sobre as atividades gliconeogênica e neoglicogeniogênica, assim como, a atividade e a expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase no músculo do *C. granulatus* alimentados com dietas ricas em proteínas ou carboidratos. Também, determinar sob as mesmas condições experimentais, outras vias do metabolismo do lactato em *C. granulatus*.

Para este estudo foram utilizados caranguejos *C. granulatus*, alimentados com dietas ricas em proteínas ou carboidratos, submetidos a hipóxia ambiental (4,5% de O<sub>2</sub>) durante 8 horas e períodos de recuperação após a hipóxia, em normóxia, de 3 e 24 horas. Foram utilizados 16 animais por dieta experimental, subdivididos em 4 animais por período experimental (normóxia, hipóxia, 3 horas de recuperação e 24 horas de recuperação).

No presente trabalho, aumentos na incorporação de <sup>14</sup>C-lactato em glicose e na atividade da enzima PEPCK no músculo mandibular foram constatados às 8 horas de hipóxia. Os valores de lactato e de glicose circulantes estão elevados, porém a concentração de glicogênio muscular diminuiu marcadamente. em ambos os grupos experimentais (HP e HC). Nos animais alimentados com a dieta HC a expressão da PEPCK aumentou significativamente. Nos caranguejos que receberam a dieta HP, não foi necessário o aumento da expressão de PEPCK, somente sua atividade, em resposta a hipóxia ambiental de 8 horas. em *C. granulatus* o lactato desapareceu lentamente da hemolinfa durante o período de recuperação pós-hipóxia. Contudo, nos animais que receberam a dieta HP a restauração dos níveis de lactato hemolinfático ocorreu mais rapidamente que naqueles mantidos com a dieta HC. O retorno à normóxia diminuiu marcadamente a incorporação do <sup>14</sup>C-lactato em glicose nos caranguejos mantidos com a dieta HC, quando comparada aos valores obtidos em hipóxia. Esta diminuição foi acompanhada pela redução na expressão e na atividade da PEPCK. No grupo HP a atividade gliconeogênica, a atividade e expressão da PEPCK mantiveram-se elevadas no período de recuperação da hipóxia. A incorporação do <sup>14</sup>C-lactato em glicogênio aumentou, em ambas dietas, após 24 horas de recuperação da hipóxia.

Os resultados do presente trabalho sugerem que a gliconeogênese e a neoglicogeniogênese, no músculo mandibular, são importantes mecanismos na metabolização do lactato gerado no período de hipóxia e que a expressão da PEPCK na isoforma mitocondrial é controlada pelo teor de oxigênio no meio e pela composição da dieta administrada aos caranguejos, sendo este um mecanismo adaptativo do *C. granulatus* em situações de anoxia e hipóxia ambiental.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**$\alpha$ -KG-**  $\alpha$ -cetogluturato

**ANOVA-** Análise de variância

**ATP-** Adenosina trifosfato

***C. granulatus-*** *Chasmagnathus granulatus*

**CHH-** Hormônio hiperglicêmico

**DHAP-** Diidroxiacetona fosfato

**FBPase-** Frutose 1,6-bifosfatase

**GIH-** Hormônio inibidor gônadal

**GTP-** Guanosina trifosfato

**G6Pase-** Glicose-6-fosfatase

**HEPES-** N-(2-hidroxiethyl) piperazine-N- (2- ethanesulfonic acid)

**HC-** Dieta rica em carboidratos

**HP-** Dieta rica em proteínas

**MO-IH-** Hormônio inibidor do órgão mandibular

**NADH-** Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

**OAA-** Oxaloacetato

**PEPCK-** Fosfoenolpiruvato carboxiquinase

**PC-** Piruvato carboxilase

**PEP-** Fosfoenolpiruvato

**PMSF-** Fluoreto de fenilmetilsulfonil

**SFC-** Solução fisiológica de caranguejo

**TCA-** Ácido tricloracético

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b> - Via gliconeogênica a partir do lactato.....	14
<b>Tabela 1</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre as concentrações hemolinfáticas de lactato e de glicose em caranguejos <i>Chasmagnathus granulatus</i> alimentados com dietas ricas em proteínas (HP) ou em carboidratos (HC) .....	29
<b>Tabela 2</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre as concentrações de lactato na água do aquário de caranguejos <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com dietas ricas em proteínas (HP) ou em carboidratos (HC).....	30
<b>Figura 2</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a concentração de glicogênio no músculo do caranguejo <i>Chasmagnathus granulatus</i> previamente alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC).....	31
<b>Figura 3</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a formação de $^{14}\text{CO}_2$ no músculo do caranguejo <i>Chasmagnathus granulatus</i> previamente alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC).....	33
<b>Figura 4</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade gliconeogênica a partir $^{14}\text{C}$ L-lactato no músculo do caranguejo <i>Chasmagnathus granulatus</i> alimentado com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC).....	34
<b>Figura 5</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade neoglicogeniogênica a partir $^{14}\text{C}$ -lactato no músculo do caranguejo <i>Chasmagnathus granulatus</i> . alimentado com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC).....	35
<b>Tabela 3</b> - Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade da PEPCK muscular em caranguejos <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com dietas ricas em proteínas (HP) ou em carboidratos (HC).....	36
<b>Figura 6</b> - A: Gel representativo da expressão da PEPCK no músculo <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com dietas ricas em proteínas. B: Análise densitométrica dos níveis da PEPCK mRNAs no músculo <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com dietas ricas em proteínas.....	38
<b>Figura 7</b> - A: Gel representativo da expressão da PEPCK no músculo <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com dietas ricas em carboidratos. B: Análise densitométrica dos níveis da PEPCK mRNAs no músculo <i>Chasmagnathus granulata</i> alimentados com dietas ricas em carboidratos.....	39

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	8
2. OBJETIVOS .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	19
3.1 Animais .....	19
3.2 Procedimento experimental .....	19
3.3 Gliconeogênese e neoglicogeniogênese .....	21
3.4 Formação de $^{14}\text{CO}_2$ .....	23
3.5 Atividade enzimática .....	23
3.6 Extração total de RNA .....	24
3.7 Determinação do mRNA da PEPCK .....	24
3.8 Determinações bioquímicas .....	25
3.9 Análises estatísticas .....	26
4. RESULTADOS .....	27
5. DISCUSSÃO .....	40
6. CONCLUSÕES .....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50
8. ARTIGO CIENTÍFICO.....	57

## 1. INTRODUÇÃO

O caranguejo *Chasmagnathus granulatus* é uma espécie típica de estuário que evoluiu a partir de formas marinhas e situa-se sistematicamente na Superclasse Crustácea, Classe Malacostraca, Ordem Decapoda e Família Varunidae (Cuesta e cols., 2001). Habita pântanos salgados ou marismas de estuários neotropicais do Brasil, a partir do litoral do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul, além de estar distribuído ao longo de toda a costa do Uruguai até o golfo de San Martín, na Argentina (Boschi, 1964).

Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinhos e límnicos, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros com exposição do substrato. Esses ecossistemas sofrem influência de fatores oceanográficos e meteorológicos, impondo à sua biota um elevado estresse ambiental (Kinne, 1993). O estresse pode ser gerado pelas variações de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido na água e do ciclo de marés (Cooper, 1974; Odum, 1985).

Em seu habitat, o *C. granulatus* abre galerias ou tocas com profundidades variáveis de acordo com o nível das marés e o lençol freático, de maneira que no fundo da toca sempre haja água. Essas habitações têm papel importante na ecofisiologia do *C. granulatus*, pois minimizam as variações de salinidade, de temperatura e do teor de oxigênio (Turcato, 1990). Na lagoa Tramandaí-RS, onde populações de *C. granulatus* são encontradas em abundância, os animais sofrem períodos prolongados de hipóxia ou de anoxia, pois o teor de O<sub>2</sub> dissolvido na água pode variar de 2,80 mg O<sub>2</sub>/L a 11,78 mg O<sub>2</sub>/L, podendo chegar a valores próximos de zero durante o inverno, quando os animais permanecem recolhidos às tocas. Também quando os caranguejos saem em busca de alimento permanecem longos períodos fora d'água, suportando períodos de hipóxia ou de

anoxia ambiental (Turcato, 1990). Devido a essas características ecológicas e comportamentais o *C. granulatus* é um excelente modelo biológico para o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos nas respostas às alterações do teor de oxigênio ambiental.

Esse caranguejo, apesar de apresentar um sistema respiratório inviável à respiração aérea (Santos e cols.,1987) é capaz de suportar longos períodos fora d'água e de exposição ao sol sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon e cols., 1974). Algumas espécies de caranguejos, como o *C. granulatus*, possuem a habilidade de manter as brânquias sempre umedecidas, quando estão fora do ambiente aquático, por meio de um sistema de circulação nas bases dos pereiópodos que captam a água da superfície externa do corpo e a liberam na cavidade branquial, promovendo a renovação do teor de oxigênio (Hartnoll, 1988; Bond-Buckup e cols., 1991; Luquet e cols., 2000).

Segundo D'Incao e cols. (1990), o caranguejo *C. granulatus* é uma espécie com hábito alimentar oportunista. A análise do conteúdo estomacal destes caranguejos mostrou, no outono e no inverno, restos de vegetais; na primavera maior frequência dos itens de origem animal; e no verão, equilíbrio entre os dois itens alimentares. Eventualmente o caranguejo *C. granulatus* comporta-se como carnívoro, atacando sua própria espécie e outros crustáceos, sendo então classificado como carnívoro-detritivo (Botto e Irygoyen, 1980).

Os crustáceos utilizam três estratégias adaptativas que permitem a sobrevivência em hipóxia ou anoxia ambiental: 1) manutenção em todos os tecidos de altas concentrações de glicogênio e de fosfato em condições aeróbias; 2) utilização de vias anaeróbias para produção de ATP; 3) redução da atividade metabólica (Hervant e cols., 1995; Childress e Seibel, 1998).

Respostas comportamentais, respiratórias, circulatórias e alterações na afinidade da hemocianina ao O<sub>2</sub> também foram constatadas em crustáceos durante a hipóxia ou a anoxia ambiental. Hervant e cols. (1995), após submeterem *Niphargus rhenorhodanensis* e *Gammarus fossarum* a uma severa hipóxia ambiental e a fase de recuperação, constataram na primeira hora de hipóxia, uma diminuição significativa da atividade locomotora. Durante o período de recuperação da hipóxia, os caranguejos aumentaram significativamente a atividade locomotora quando comparados ao grupo hipóxia. No entanto, no período de recuperação, a atividade de locomoção foi menor quando comparada àquela do grupo controle em normóxia (Hervant e cols., 1995).

No *C. granulatus*, Santos e cols. (1987) constataram uma redução do consumo de oxigênio e da atividade de locomoção após duas horas de hipóxia ambiental. Gonçalves (1993) constatou uma diminuição da atividade motora e da frequência cardíaca em *C. granulatus* submetido à anoxia ambiental durante doze horas.

Em períodos de normóxia, a glicose, principal monossacarídeo na hemolinfa de crustáceos, é armazenada na forma de glicogênio, principalmente, no músculo, no hepatopâncreas, no coração, nos hemócitos e nas brânquias, sugerindo que a ausência de um depósito central de glicogênio seria uma adaptação importante para caranguejos que em seu habitat estariam submetidos a períodos de hipóxia ambiental e que possuem o sistema circulatório do tipo aberto com baixa pressão e fluxo lento, determinando uma distribuição menos efetiva de glicose para os tecidos (Hochachka e Somero, 1984).

O lactato é o principal produto do metabolismo anaeróbico em crustáceos, sendo acumulado na hemolinfa e em diferentes tecidos após situações de anoxia ou de hipóxia ambiental ou funcional (Van Aardt, 1988; Anderson e cols., 1994; Hervant e cols., 1995, 1996, 1997; Zou e cols., Wachter e cols., 1997). Durante o exercício extenuante os crustáceos produzem altas concentrações de lactato, sendo este metabólito responsável

pela acidose induzida pelo exercício físico nestes caranguejos (Wood e Randall, 1981; Henry e cols., 1994; Morris e Adamczewska, 2002). O aumento da concentração do lactato na hemolinfa e nos tecidos está associado à mobilização de glicogênio tecidual. (Chang e O' Connor, 1983; Hervant e cols., 1999; Morris e Adamczewska, 2002; Oliveira e cols., 2004). Em *C. granulatus* mantidos com dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP) e submetidos ao estresse por anoxia ambiental durante 8 horas, as concentrações de lactato e de glicose na hemolinfa aumentaram 10-14 vezes, quando comparadas aos grupos em normóxia (Oliveira e cols., 2001; Oliveira e cols., 2004). Durante a fase de recuperação da anoxia, a concentração de lactato na hemolinfa de caranguejos alimentados com dieta HP retornou, mais rapidamente, a valores semelhantes ao do grupo normóxia, quando comparada aquela em caranguejos alimentados com dieta HC (Oliveira e cols., 2004). Esta redução do lactato hemolinfático foi acompanhada de aumento na incorporação do  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose no hepatopâncreas (Oliveira e cols., 2004).

Schein e cols. (2004) demonstraram a capacidade de incorporação de  $^{14}\text{C}$ -L-alanina em glicose e as atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) no músculo desse caranguejo, durante o estresse osmótico.

Em *C. granulatus* a relação (mmol/L / mmol/L) lactato/glicose na hemolinfa, em animais alimentados é elevada, o que sugere que o lactato é um importante substrato para este caranguejo (Pellegrino, 2006). Em *C. granulatus*, o lactato pode ser oxidado no hepatopâncreas e no músculo (Marqueze 2004; Marqueze e cols., 2006) ou convertido em glicose no hepatopâncreas (Oliveira e cols., 1997; 2004).

O hormônio hiperglicêmico (CHH) é um dos neurohormônios mais estudados em crustáceos. O CHH já foi isolado em diversas espécies de crustáceos e sua estrutura

primária determinada (Kegel e cols., 1989; Keller, 1992; Hsu e cols., 2006; Fanjul-Moles, 2006). O CHH é membro da família de peptídeos que inclui o hormônio inibidor da muda (MIH), o hormônio inibidor gônadal (GIH) e o hormônio inibidor do órgão mandibular (MO-IH) (Chang, 1987; Wainwright e cols, 1996; Hsu e cols., 2006; Fanjul-Moles, 2006). O CHH é produzido e secretado pelo complexo órgão X/glândula do seio. No entanto, isoformas de CHH foram constatadas no coração, nas brânquias e no trato digestório de diferentes crustáceos (Udomkit e cols. 2004). A principal função do CHH é a regulação da concentração da glicose na hemolinfa de crustáceos. Santos e Keller (1993) propõem que a glicose circulante agiria por retroalimentação negativa sobre a secreção de CHH. Entretanto o lactato circulante estimularia a produção hormonal. Em crustáceos submetidos à hipóxia ou anoxia, as concentrações de CHH e de glicose na hemolinfa aumentam, indicando o envolvimento deste hormônio no ajuste metabólico em resposta a anaerobiose.

A gliconeogênese é a síntese ou formação de glicose a partir de vários substratos. Inclui o uso de vários aminoácidos, o lactato, o piruvato, o propionato e o glicerol como fontes de carbono para esta via metabólica. A capacidade de sintetizar glicose é fundamental para a sobrevivência na maioria dos organismos animais. A gliconeogênese permite, mesmo depois de toda a glicose da dieta ter sido absorvida e completamente oxidada, a manutenção dos níveis de glicose no sangue ou na hemolinfa (Devlin, 2002).

A gliconeogênese (Fig. 1) a partir do lactato é um processo que requer ATP, com a seguinte equação geral:



A etapa inicial é a conversão de lactato em piruvato pela lactato desidrogenase o NADH é gerado e necessário para a etapa subsequente da via. O piruvato é convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) pelo acoplamento de duas reações que requerem compostos

de fosfato de alta energia (1 ATP e 1 GTP). A primeira é catalisada pela piruvato carboxilase (PC) e a segunda pela PEPCK. A localização intracelular da PC torna a mitocôndria obrigatória para a conversão do piruvato citosólico em PEP citosólico. Então, há duas vias que podem ser adotadas pelo oxaloacetato para chegar à glicose (Fig. 1). Isso acontece porque a PEPCK está presente tanto no compartimento citosólico como no mitocondrial. A via mais simples envolve a PEPCK mitocondrial. O oxaloacetato é convertido, dentro da mitocôndria, em PEP que, então atravessa a membrana mitocondrial interna. Na segunda o oxaloacetato é convertido em aspartato que é transportado para fora pelo antiporte glutamato-aspartato. No citosol, transaminação com  $\alpha$ -cetogluturato converte o aspartato novamente em oxaloacetato (Devlin, 2002).

A atividade das enzimas chave, envolvidas na gliconeogênese, piruvato carboxilase (PC), fosfoenolpiruvato carboxikinase (PEPCK), frutose 1,6-bifosfatase (FBPase), e glicose 6-fosfatase (G6Pase) é relatada em diversas espécies de vertebrados e invertebrados e a atividade destas enzimas está correlacionada com a produção de glicose (Moon, 1988, Suarez and Mommsen, 1987;). A distribuição da PEPCK entre as frações celulares varia entre as espécies (Kraus-Friedmann, 1984; Moon, 1988). Conforme a espécie estudada, a PEPCK pode se localizar no citosol, na mitocôndria ou em ambos compartimentos, como ocorre em humanos (Marks e cols., 1996). Em ratos e camundongos, a PEPCK hepática é principalmente citoplasmática, em outros mamíferos, como nos coelhos e nos porcos da Índia (Wiese et al., 1991) ocorre nos dois compartimentos do hepatócito. Em aves, a PEPCK hepática é mitocondrial (Moon, 1988).



(Land e Hochachaka, 1993). Em anfíbios, durante a metamorfose, verifica-se aumento da atividade da PEPCK citosólica e da capacidade gliconeogênica a partir de aminoácidos. Foram identificadas PEPCKs mitocondrial e citosólica no fígado de rãs (Prosser, 1991).

A regulação transcricional da expressão gênica da PEPCK (forma citosólica) é modulada por dieta ou sinalização hormonal, o que resulta em alteração na síntese desta enzima. (Hanson e Reshef, 1997; Panserat e cols., 2001). No entanto, nos vertebrados, a PEPCK mitocondrial hepática é expressa constitutivamente (Hanson e Reshef, 1997; Panserat e cols., 2001). Os elementos regulatórios que controlam a transcrição do gene da PEPCK no fígado, nos rins e no tecido adiposo têm sido alvo de pesquisa, e muitos dos fatores de transcrição que se ligam a esses fatores já foram identificados. Glucagon, cAMP, hormônios da tireóide e glicocorticóides possuem efeito positivo sobre a transcrição gênica da PEPCK citosólica, enquanto que insulina e glicose a inibem (Panserat e cols., 2001; Hanson e Reshef, 1997; Scott e cols., 1998; Cournarie e cols., 1999). Em mamíferos e frangos, o estado nutricional, a composição da dieta e os hormônios têm efeitos sobre a expressão gênica da isoforma citosólica enquanto que sobre a isoforma mitocondrial, constitutiva, não houve modificação no padrão de expressão gênica (Weldon et al., 1990; Hanson and Reshef, 1997). Diversos trabalhos sugerem que a gliconeogênese a partir do lactato ocorre em altos níveis em espécies com grande porcentagem de PEPCK mitocondrial, indicando que seria um mecanismo adaptativo para o enfrentamento de altos níveis de lactato no organismo (Land e Hochachaka, 1993; Suarez e Momsen, 1987; Modaressi e cols., 1996).

Os estudos sobre a presença da via gliconeogênica em crustáceos são escassos e contraditórios, vários tecidos têm sido propostos como sítios para a gliconeogênese, como o hepatopâncreas (Van Aardt, 1988; Lallier e Wash, 1991; Oliveira e Da Silva,

1997; Hervant e cols., 1999), as brânquias (Thabrew e cols., 1971; Chittó e cols., 2007), os hemócitos (Johnston e cols., 1973) e o músculo (Schein e cols., 2004). No entanto, peculiaridades biológicas e ecológicas das diferentes espécies de crustáceos contribuem para uma grande variabilidade e controvérsia sobre a atividade da PEPCK nas diferentes espécies e tecidos nessa classe de invertebrados (Henry e cols., 1994; Hervant e cols., 1999; Le Moullac e cols., 2007).

Em caranguejos *C. granulatus* a via gliconeogênica parece estar envolvida em vários processos de ajuste metabólico durante o estresse osmótico, a anoxia e a fase de recuperação pós-anoxia. Nesse caranguejo a via gliconeogênica completa foi constatada no músculo, no hepatopâncreas e nas brânquias (Oliveira e Da Silva, 1997; Schein e cols., 2004; Chittó, 2000, Chittó e cols., 2007).

Schein e cols. (2004) demonstraram que no músculo da mandíbula do *C. granulata* mais de 90% da atividade da PEPCK é mitocondrial. No hepatopâncreas, Oliveira e Da Silva (1997) encontraram valores entre 84 e 89% de atividade mitocondrial da PEPCK, evidenciando similaridade com valores encontrados no músculo. Em crustáceos, a ocorrência de gliconeogênese e neoglicogeniogênese já foi demonstrada pela incorporação de  $^{14}\text{C}$ -lactato,  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos e  $^{14}\text{C}$ -glicerol em glicose ou glicogênio em diferentes tecidos (Henry e cols., 1994; Schein e cols., 2004; Pellegrino, 2006; Chittó e cols., 2007).

O gene da PEPCK é expresso em vários tecidos do *C. granulata* como no hepatopâncreas, no músculo da mandíbula, no sistema nervoso, no coração e nas brânquias (Schein e cols., 2004). Schein e cols. (2004) verificaram um aumento significativo na expressão e na atividade da PEPCK durante o choque hiperosmótico, sugerindo que a gliconeogênese colabora no ajuste metabólico durante este tipo de estresse.

Em crustáceos, as vias da metabolização ou eliminação após a anoxia ou hipóxia ainda são pouco conhecidas, e o desaparecimento do lactato da hemolinfa ocorre lentamente (Henry e cols., 1994; Zou e cols., 1996; Hervant e cols., 1999).

No grupo de caranguejos *C. granulatus* que receberam a dieta HP, Oliveira e cols. (2004) verificaram, na fase de recuperação da anoxia de 8 horas, que a produção de  $^{14}\text{C}$ -glicose a partir de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato no hepatopâncreas aumentou significativamente às 12 e 18 horas, sugerindo a participação da via gliconeogênica hepatopancreática na metabolização do lactato. Entretanto, nos caranguejos alimentados com a dieta HC, não ocorreu participação significativa da via gliconeogênica hepatopancreática na metabolização do lactato. Assim, a hipótese que nos caranguejos mantidos com a dieta HC ou HP a gliconeogênese e/ou a neoglicogeniogênese muscular seriam vias que participariam do metabolismo do lactato em *C. granulatus*, precisava de comprovação. Também o conhecimento de outras rotas de metabolização de lactato no período pós-hipóxia serão esclarecedoras para o entendimento do papel deste substrato em crustáceos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de diferentes tempos de hipóxia ambiental e da recuperação da hipóxia sobre as atividades gliconeogênica e neoglicogeniogênica, assim como, a atividade e a expressão da fosfoenolpiruvato carboxiquinase no músculo do *C. granulatus* alimentados com dietas ricas em proteínas ou carboidratos. Também, determinar sob as mesmas condições experimentais, outras vias do metabolismo do lactato em *C. granulatus*.

Para isto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1) Determinar as variações dos níveis de glicose e de lactato hemolinfáticos e de lactato na água dos aquários, assim como, de glicogênio no músculo mandibular em caranguejos alimentados com dieta rica em carboidratos ou proteínas submetidos à hipóxia durante 8 horas e à recuperação em normóxia durante 3 ou 24 horas. Também avaliar, *in vitro*, sob as mesmas condições experimentais a formação de  $^{14}\text{CO}_2$ , de  $^{14}\text{C}$ -glicose e de  $^{14}\text{C}$ -glicogênio a partir de  $[\text{U-}^{14}\text{C}]$  L-lactato no músculo mandibular.

2) Determinar, sob as mesmas condições experimentais, a atividade e a expressão da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) em músculo mandibular de caranguejos alimentados com a dieta rica em carboidratos ou proteínas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados caranguejos *Chasmagnathus granulatus* machos, em estágio C do ciclo de intermuda segundo os critérios de Drach e Tchernigovtzeff (1967). Os animais pesavam entre 15 e 17g e foram coletados na lagoa Tramandaí-RS. No laboratório os animais permaneceram em aquários aerados (18,95% de O<sub>2</sub> dissolvido na água), salinidade de 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, temperatura de 25<sup>0</sup>C e ciclo claro/escuro natural. Após as coletas os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante 10 dias. Foram utilizados somente animais coletados na primavera e verão. No laboratório os animais foram submetidos a um choque hiposmótico (permanência em água doce) por 24 horas, a fim de limpar o conteúdo estomacal e eliminar possíveis parasitas.

#### 3.2 Procedimento experimental

Após os 10 dias de aclimação, os animais foram divididos em dois grupos conforme a dieta administrada: rica em carboidratos ou proteínas. As dietas foram administradas durante 15 dias, *ad libitum*, ao final da tarde (período de maior atividade dos animais em seu habitat). As dietas continham: a rica em proteínas (HP - carne bovina crua), 21,59% de proteína; 0,03% de carboidrato; 6,71% de gordura; 0,35% de cinzas; 0,31% de fibra; 71,01% de umidade e valor calórico total de 146,87 cal/100g; a rica em carboidratos (HC - arroz cozido) com 3,34% de proteína; 34,56% de carboidrato; 0,45% de gordura; 0,02% de cinzas; 0,30% de fibra; 61,33% de umidade e valor calórico total de 155,65 cal/100g (análises bromatológicas feitas no Instituto de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul). As dietas eram isocalóricas.

Durante os 15 dias de administração das dietas os caranguejos foram mantidos em aquários com 18,95% de O<sub>2</sub> dissolvido na água, salinidade de 20<sup>0</sup>/<sub>00</sub>, temperatura de 25<sup>0</sup>C e ciclo claro/escuro natural. Ao final deste período de aclimação às dietas, os animais foram pesados e medidos, não sendo constatadas variações significativas em seus pesos.

Para o estudo da hipóxia foram utilizados 2 aquários de 20L (1 para cada dieta experimental) com 4,5% de O<sub>2</sub>. A redução do nível de oxigênio foi obtida por aeração da água dos aquários com gás nitrogênio, monitorada com o auxílio de um oxímetro (World Precision Instruments modelo Oxel-1/ISSO<sub>2</sub>). Quando o teor de oxigênio na água chegava ao valor desejado, 12 animais eram colocados em cada aquário que eram imediatamente lacrados. A partir deste momento foi contado o tempo experimental de 8 horas de hipóxia e após e retirados 4 animais de cada aquário para o estudo da hipóxia.

Nos experimentos sobre o efeito da recuperação, os animais foram mantidos em hipóxia por 8 horas como descrito acima, após grupos de 8 animais, por dieta experimental, foram colocados em diferentes aquários com água em normóxia (18,95% de O<sub>2</sub> dissolvido na água) e mantidos nestas condições por 3 ou 24 horas de recuperação, sendo 4 animais por período de recuperação. O grupo controle foi mantido em todo o período experimental em normóxia. Ao final dos períodos experimentais (normóxia, hipóxia e recuperação de 3 ou 24 horas), os animais foram imediatamente crioplanados (cerca de 5 minutos) e amostras de músculo mandibular foram coletadas e utilizadas nos diferentes protocolos experimentais. Portanto foram utilizados 4 animais por período experimental, em cada dieta utilizada. A hemolinfa desses animais foi coletada das articulações do 4<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> periópodos, empregando-se como anticoagulante oxalato de potássio 10%, e utilizada para as determinações bioquímicas de glicose e lactato.

### 3.3 Gliconeogênese e neoglicogenogênese

Os músculos mandibulares incisados foram colocados em placas de Petri sobre gelo contendo solução fisiológica (SFC) para *C. granulatus* [300 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8,8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, plus 10 mM HEPES e 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), pH 7,8].

Para as avaliações das capacidades gliconeogênica e neoglicogenogênica, os tecidos ( $50 \pm 2$  mg) foram incubados em 500µl de SFC em presença de 0,2 µCi [U-<sup>14</sup>C] L-lactato (157 mCi/mmol Amersham International) mais 15 mM L-lactato, a 25°C sob agitação constante durante 120 minutos, segundo a técnica descrita por Oliveira e Da Silva (1997). Decorrido o tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, os tecidos retirados. O meio de incubação foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, o sobrenadante desproteinizado com Ba(OH)<sub>2</sub> saturado e ZnSO<sub>4</sub> 2%, sendo novamente centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm. Sobrenadante, resultante desta centrifugação, foi utilizado para a determinação da <sup>14</sup>C-glicose formada a partir do <sup>14</sup>C-lactato e liberada no meio de incubação.

A determinação da <sup>14</sup>C-glicose foi realizada por meio de cromatografia de camada fina, conforme método descrito por Backer e cols. (1965). Como solução carreada foram utilizados n-butanol, álcool etílico (95%) e ácido acético (5,4%) na proporção de 250:158:92 (v/v/v). As manchas foram reveladas com uma solução de álcool etílico (95%), ácido sulfúrico concentrado e anisaldeído na proporção de 18:1:1 (v/v/v), após raspadas e colocadas diretamente em vials contendo tolueno-triton X100 (2:1, v/v) -PPO 0,4%, POPOP 0,01% e a radioatividade era medida em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. A atividade gliconeogênica foi medida pela da incorporação do <sup>14</sup>C do L-lactato em glicose no meio de incubação. Os valores da atividade gliconeogênica foram

expressos em nmoles de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato convertido em glicose.  $\text{g}^{-1}$  de tecido.  $\text{h}^{-1}$  de incubação.

A atividade neoglicogeniogênica foi medida pela incorporação do  $^{14}\text{C}$  do L-lactato em glicogênio nas amostras de músculo mandibular incubadas como descrito acima. Para a determinação do  $^{14}\text{C}$ -glicogênio as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo, os tecidos lavados por três vezes em SFC gelado, secos em papel filtro, colocados em 200 $\mu\text{l}$  de KOH (0,5N) e levados ao banho de 80°C por 1 hora. Depois desta etapa, foram retiradas amostras (50 $\mu\text{L}$ ) para a determinação de proteínas totais. Às amostras de tecidos hidrolisados foram acrescentados TCA 30% e HCL 1N (2:1 v/v), respectivamente, para a desproteinização e a neutralização. Então, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 600xg. Os sobrenadantes (30 $\mu\text{L}$ ) foram pipetados em papel Whatman 3MM. Para a precipitação do  $^{14}\text{C}$ -glicogênio no papel, os filtros foram lavados por 2 vezes em álcool etílico (66%), a primeira por 30 minutos e a segunda por 15 minutos e após secos a temperatura ambiente (Oliveira e cols., 2001). Como branco usava-se o mesmo tipo de papel de filtro, que sofria o mesmo procedimento, mas sem a amostra de tecido. Quando secos, os filtros eram colocados em 5ml de líquido de cintilação (tolueno-triton100X (2:1, v/v)-PPO 0,4%, POPOP 0,01% e a radioatividade era medida em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos em pmol de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato convertido em glicogênio. $\text{mg}^{-1}$  de proteína. tempo de incubação.

### 3.4 Formação de $^{14}\text{CO}_2$

Para a produção de  $^{14}\text{CO}_2$  os músculos mandibulares foram incisados e colocados em placas de Petri sobre gelo, contendo solução fisiológica (SFC) para *C. granulatus* [300 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8,8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, plus 10 mM HEPES e 0,1 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF), pH 7,8].

As amostras ( $50 \pm 2$  mg) foram incubadas em frascos com 1ml de SFC contendo 0,2  $\mu\text{Ci}$  [U- $^{14}\text{C}$ ] L-lactato (157mCi/mmol Amersham, Internacional) mais 10mM de L-lactato. Os frascos foram incubados selados a 25°C, sob agitação constante, por 60 minutos. Inseridos às tampas de borracha dos frascos foram colocados poços de vidro dentro dos quais foram colocados papéis 3MM Whatman. Durante o processo de incubação, os poços permaneciam acima do meio de incubação. O processo de produção de  $^{14}\text{CO}_2$  foi interrompido pela injeção de 0,2ml de TCA 50% ao SFC e 0,2ml de hidróxido de sódio 2M aos poços, através da tampa de borracha. Os frascos lacrados ficavam à temperatura ambiente por uma noite, após os poços com o papel eram colocados em vials contendo tolueno-tritonX100 (2:1, v/v)- PPO 0,4%, POPOP 0,01% e a radioatividade era medida em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência (Torres e cols., 2001). Os valores da produção de  $^{14}\text{CO}_2$  foram expressos em nmol de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato convertido em  $^{14}\text{CO}_2 \cdot \text{g}^{-1}$  de tecido  $\cdot \text{h}^{-1}$  de incubação.

### 3.5 Atividade enzimática

A determinação da PEPCCK (E. C. 4.1.1.32) foi realizada segundo Migliorini e cols. (1973) e adaptada para o tecido de caranguejo por Oliveira e Da Silva (1997). O músculo mandibular (cerca de 500mg) de caranguejos dos diferentes grupos experimentais era homeogeneizado em 0,25 M de sacarose mais PMSF 1:3:0,020 (w/v/v)

com um homogeneizador de teflon mergulhado em banho de gelo. O homogeneizado era centrifugado a 600xg por 10 minutos, o sobrenadante obtido era centrifugado a 10000xg por 10 minutos, todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. A atividade da PEPCK era determinada pela reação de troca de  $H^{14}CO_3$  (Dupont 277,5 MBq/mmol)-oxalacetato. A reação era interrompida pela adição de TCA 5%. Após centrifugação, a solução era gaseificada com  $CO_2$  por 2 minutos e amostras eram imediatamente colocadas em vials contendo tolueno-triton X100 (2:1, v/v)- PPO 0,4%, POPOP 0,01% e a radioatividade era medida em um aparelho LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os valores dos brancos eram obtidos na ausência de ITP. Dos valores obtidos das amostras de tecidos eram subtraídos os valores dos brancos. Atividade da PEPCK foi expressa em nmoles  $H^{14}CO_3$  incorporados em oxaloacetato.  $mg^{-1}$  of proteína.  $min^{-1}$ .

### **3.6 Extração total de RNA**

A extração do RNA total foi feita seguindo o método guanidina tiocianato de Chomczynski e Sacchi (1987) usando solução de Trizol (Gibco).

### **3.7 Determinação do mRNA da PEPCK em músculo mandibular: análise por PCR (polymerase chain reaction)**

O cDNA produzido a partir do mRNA total do tecido muscular, foi utilizado para a amplificação por PCR de uma seqüência de 428pb da PEPCK, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos 5' – GGG GTG CAG GTG ACA GAC TC – 3' AND 5' – GGG TGT CAT CAT GGC CAG GTT – 3' que foram escolhidos a partir de seqüências conservadas do cDNA da PEPCK (GenBank nº AY074922) do caranguejo *Chasmagnathus granulatus*. As reações de PCR foram executadas em volume final de

50µl contendo 1,5 mmol<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 pmol de cada primer, 1 µl de cDNA e 1 U de AmpliTaq DNA polimerase (Gibco). PCR foi realizada usando 40 ciclos para hibridização a 60<sup>o</sup>C por minuto, 60 ciclos para elongação a 72 <sup>o</sup>C e 35 ciclos para desnaturação a 94 <sup>o</sup>C.

A análise dos fragmentos de cDNA em gel de agarose foi usando o ImageMaster<sup>®</sup> Vídeo Documentation System para Gel Eletroforese (VDS; Pharmacia Biotech) e o 16S de *C. granulatus* (GenBank nº AJ250640) foi escolhido como normalizador usando 5' – TAG CAT AAT CGT TAG TTT TTT AAT T – 3' E 5' – TTA AAT TCA ACA TCG AGG TCG CAA – 3' como oligonucleotídeos e o tamanho do produto do PCR foi de 382bp.

### **3.8 Determinações Bioquímicas**

A concentração de lactato na hemolinfa e na água dos aquários foi determinada por meio de kit da Boehringer (nº 139.084) e os resultados expressos em mmol de ácido láctico por litro.

A concentração de glicose foi determinada pelo método glicose oxidase por meio do Kit Enz-color da Labtest e os resultados expressos em mmol de glicose por litro.

O glicogênio muscular foi extraído pelo método de Van Handel (1965) e após hidrólise ácida determinado como glicose. Os resultados foram expressos como g% de glicogênio.

A determinação da concentração de proteínas nos tecidos foi realizada pelo método de Bradford (1976) e como padrão foi utilizada albumina bovina. Os resultados foram expressos por mg de proteína. g<sup>-1</sup> de tecido.

### **3.9 Análises Estatísticas**

Os animais foram divididos em grupos controle, 8 horas de hipóxia, 3 horas de recuperação e 24 horas de recuperação. Para a análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via ou de duas vias, para a comparação das dietas distintas, com teste de comparação de Tukey. Foi considerado critério para significância  $P < 0,05$ . Os testes foram feitos com o programa estatístico BioEstat 3.0.

#### 4. RESULTADOS

Os resultados dos efeitos da hipóxia e da fase de recuperação sobre a concentração de glicose hemolinfática, em caranguejos alimentados com a dieta HC ou HP, estão representados na tabela 1.

Em normóxia, caranguejos alimentados com a dieta HC apresentaram valores de glicose na hemolinfa significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles constatados nos animais que receberam a dieta HP. Tanto os caranguejos que receberam a dieta HP como aqueles do grupo alimentado com a dieta HC, 8 horas de hipóxia aumentaram 12 vezes ( $p < 0,01$ ) os níveis de glicose na hemolinfa quando comparados àqueles verificados em normóxia. Nos caranguejos alimentados com a dieta HP, 3 horas de recuperação diminuíram em 66% ( $p < 0,05$ ) a concentração de glicose hemolinfática em relação ao grupo hipóxia, no entanto, os valores de glicose são superiores ( $p < 0,05$ ) aqueles verificados no grupo normóxia. Entretanto, após 24 horas de recuperação os valores de glicose na hemolinfa dos animais que receberam a dieta HP retornaram a valores semelhantes àqueles verificados no grupo normóxia. Nos animais alimentados com a dieta HC, o decréscimo da glicose hemolinfática após 3 horas de recuperação foi de 49% e os valores são significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles verificados no grupo HP na mesma situação experimental. Entretanto, após 24 horas em recuperação os valores de glicose na hemolinfa em caranguejos mantidos com a dieta HC atingiram níveis semelhantes àqueles verificados no grupo normóxia.

Também a tabela 1 mostra os efeitos da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a concentração de lactato na hemolinfa. Em normóxia, os animais que receberam a dieta HC apresentaram valores de lactato hemolinfático significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles verificados nos caranguejos mantidos com a dieta HP.

Em animais que receberam a dieta HP, 8 horas em hipóxia aumentou 12 vezes ( $p < 0,05$ ) a concentração de lactato hemolinfático quando comparada aos valores obtidos no grupo normóxia, com uma velocidade de formação de cerca de  $0,7575 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Após 3 horas em recuperação os valores de lactato na hemolinfa mantiveram-se elevados (cerca de 10 vezes;  $p < 0,05$ ) em relação ao grupo normóxia. Contudo, às 24 horas de recuperação os valores de lactato hemolinfático atingiram níveis semelhantes àqueles verificados no grupo normóxia. No grupo que recebeu a dieta HC, os níveis de lactato na hemolinfa aumentaram 3 vezes ( $P < 0,05$ ) após 8 horas em hipóxia. A velocidade de formação de lactato no grupo HC foi de cerca de  $0,6262 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Contudo, após 3 horas em recuperação os níveis de lactato na hemolinfa mantiveram-se cerca de 3 vezes ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles verificados em normóxia. Ao final do período experimental (24 horas em recuperação), os níveis de lactato hemolinfático nos caranguejos que receberam a dieta HC permaneceram cerca de 2 vezes ( $p < 0,05$ ) mais elevados que aqueles do grupo normóxia.

Nos caranguejos que receberam a dieta HP a velocidade de desaparecimento do lactato hemolinfático após 24 horas foi cerca de  $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  e nos animais alimentados com a dieta HC cerca de  $0,129 \mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Tabela 1- Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre as concentrações hemolinfáticas de lactato e de glicose em caranguejos *Chasmagnathus granulatus* alimentados com dietas ricas em proteínas (HP) ou em carboidratos (HC).

	Hemolinfa		Hemolinfa	
	Lactato (mmol/L)		Glicose (mmol/L)	
	HP	HC	HP	HC
Normóxia	0,54 ± 0,35	2,19 ± 0,70 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01 <sup>b</sup>
Hipóxia 8 horas	6,60 ± 0,30 <sup>a</sup>	7,20 ± 0,40 <sup>a</sup>	1,31 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,72 ± 0,08 <sup>ab</sup>
Recuperação 3 horas	5,50 ± 0,30 <sup>a</sup>	6,40 ± 0,30 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,87 ± 0,04 <sup>ab</sup>
24 horas	0,60 ± 0,10	4,10 ± 0,20 <sup>ab</sup>	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01

Valores médios ± desvio padrão da média

<sup>a</sup>Valores médios significativamente diferentes dos grupos controle ( $P < 0.05$ )

<sup>b</sup>Valores médios significativamente diferentes entre as dietas no mesmo grupo ( $P < 0.05$ )

n=4-7

A tabela 2 mostra o efeito da hipóxia e da fase de recuperação da hipóxia sobre a concentração de lactato na água dos aquários dos caranguejos alimentados com a dieta HP ou HC. Em normóxia, a concentração de lactato na água dos aquários dos caranguejos mantidos com a dieta HP foi semelhante àquela verificada no grupo HC. Nos animais que receberam a dieta HP, um aumento de 8 vezes ( $p < 0,05$ ) na concentração de lactato na água dos aquários foi verificado durante a hipóxia de 8 horas, que se manteve após 3 horas de recuperação. Ao final do período experimental (24 horas de recuperação), os níveis de lactato na água atingem valores semelhantes àqueles verificados no grupo em normóxia.

Nos caranguejos do grupo HC, os valores de lactato na água dos aquários aumentaram cerca de 566% ( $p < 0,05$ ) após 8 horas de hipóxia. Os valores mantiveram-se significativamente ( $p < 0,05$ ) elevados após 3 horas em recuperação. Às 24 horas de

recuperação, a concentração de lactato na água dos aquários diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) em relação às 3 horas de recuperação, porém mantendo-se 250% mais elevada que aquela constatada no grupo normóxia.

Tabela 2- Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre as concentrações de lactato na água do aquário de caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dietas ricas em proteínas (HP) ou em carboidratos (HC).

	Água aquário	
	Lactato (mmol/L)	
	HP	HC
Normóxia	0,012 ± 0,001	0,014 ± 0,001
Hipóxia 8 horas	0,062 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,081 ± 0,006 <sup>ab</sup>
Recuperação 3 horas	0,057 ± 0,004 <sup>a</sup>	0,075 ± 0,006 <sup>ab</sup>
24 horas	0,013 ± 0,001	0,042 ± 0,005 <sup>ab</sup>

Valores médios ± desvio padrão da média

<sup>a</sup>Valores médios significativamente diferentes dos grupos controle ( $P < 0,05$ )

<sup>b</sup>Valores médios significativamente diferentes entre as dietas no mesmo grupo ( $P < 0,05$ )

n=4

A figura 2 mostra os efeitos da hipóxia e da fase de recuperação da hipóxia sobre a concentração de glicogênio muscular em caranguejos alimentados com a dieta rica em carboidratos ou proteínas. No grupo que recebeu a dieta HP, a concentração de glicogênio muscular em hipóxia diminuiu 64% ( $p < 0,05$ ) quando comparada àquela observada no grupo normóxia. Às 3 horas de recuperação, a concentração do glicogênio muscular do grupo HP manteve valor semelhante aquele verificado no grupo hipóxia. Contudo, após 24 horas em recuperação, os valores de glicogênio foram semelhantes àqueles verificados no grupo normóxia.

Nos caranguejos em normóxia, a alimentação com a dieta HC aumentou os valores de glicogênio no músculo em cerca de 2 vezes ( $p < 0,05$ ) quando comparados àqueles verificados nos animais do grupo HP (Fig. 2). A concentração de glicogênio muscular do grupo HC reduziu cerca de 3 vezes ( $p < 0,05$ ) após 8 horas em hipóxia. Contudo, os tempos de recuperação estudados não foram suficientes para os valores de glicogênio no músculo dos animais do grupo HC retornassem aos níveis constatados em normóxia. Entretanto, ao longo do período experimental os valores de glicogênio dos caranguejos que receberam a dieta HC foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles verificados nos caranguejos mantidos com a dieta HP (Fig. 2).

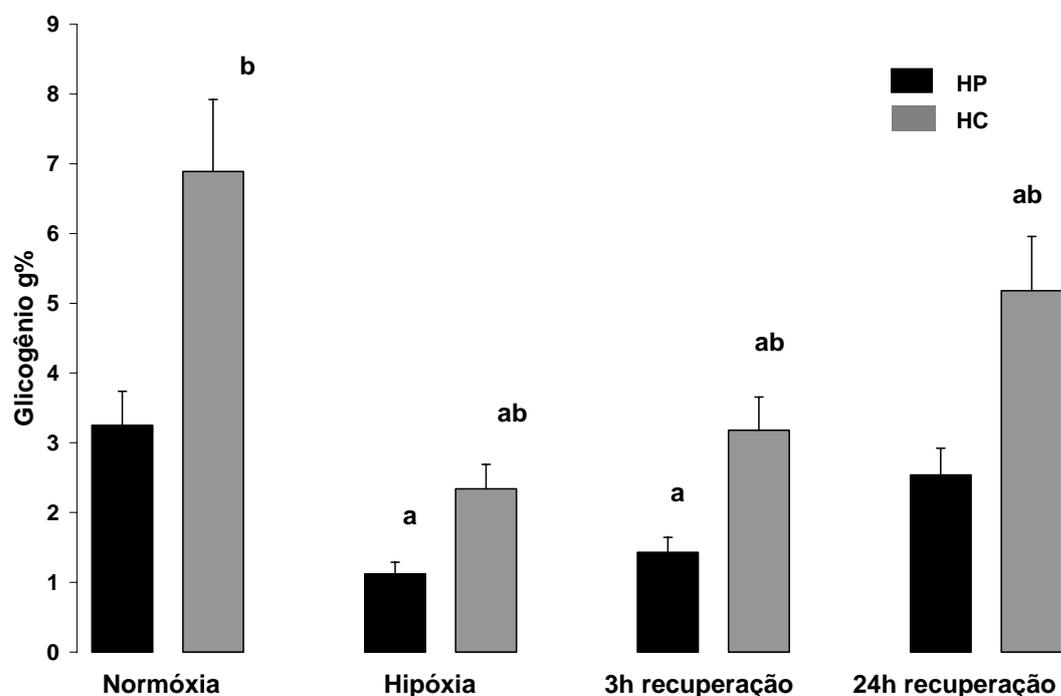


Figura 2. Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a concentração de glicogênio no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* previamente alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC). As colunas e as barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. a = valores médios diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ). b = valores médios diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as dietas do mesmo grupo.

A figura 3 mostra os efeitos da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a incorporação de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato em  $^{14}\text{CO}_2$  em caranguejos que receberam a dieta rica em carboidratos ou proteínas.

Em caranguejos alimentados com a dieta HP os valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  no músculo foram cerca de 2 vezes maiores que aqueles verificados nos animais do grupo HC em normóxia.

Nos animais que receberam a dieta rica HP, a produção de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato diminuiu cerca de 2 vezes ( $p < 0,05$ ) durante a hipóxia, quando comparada àquela verificada no grupo normóxia. Após 3 e 24 horas em recuperação, os valores de produção de  $^{14}\text{CO}_2$  foram semelhantes àquelas verificados no grupo hipóxia e significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que aqueles verificados no grupo normóxia. Às 24 horas de recuperação, apesar de apresentar valores significativamente menores que aqueles do grupo normóxia, os caranguejos do grupo HP mostram valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles verificados no grupo HC no mesmo período experimental.

Os valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -L-lactato, no músculo de caranguejos que receberam a dieta HC, não apresentaram alteração significativa ( $p > 0,05$ ) após 8 horas em hipóxia. Durante os períodos de recuperação de 3 e 24 horas os valores de formação de  $^{14}\text{CO}_2$  diminuíram significativamente ( $p < 0,05$ ), quando comparados àquelas verificados no grupo normóxia.

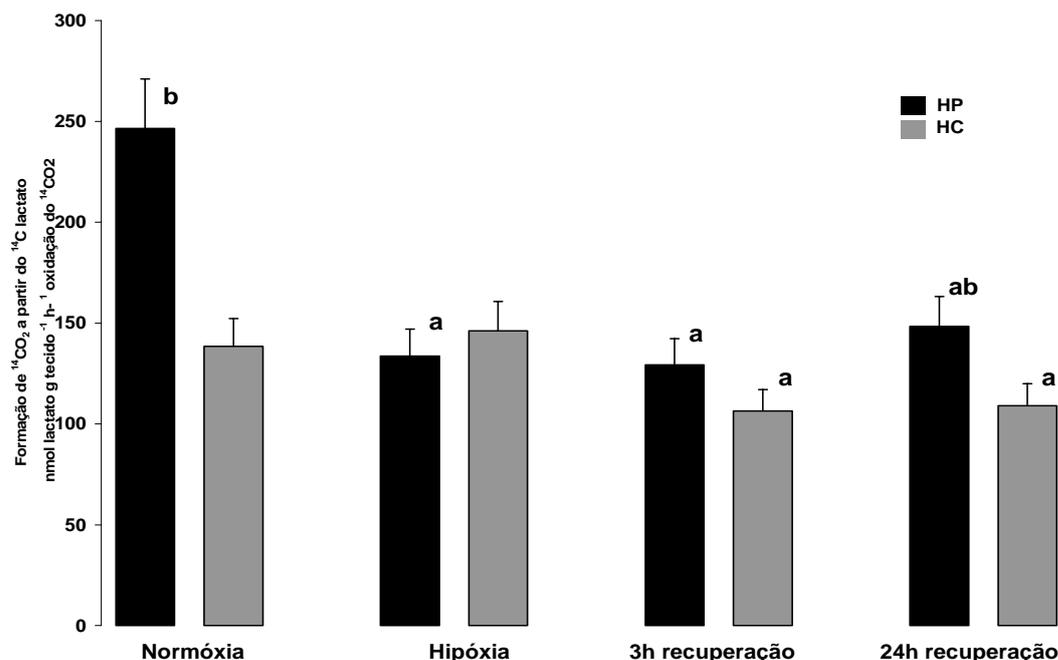


Figura 3. Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a formação de  $^{14}\text{CO}_2$ , a partir do lactato, no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* previamente alimentados com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC). As colunas e as barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. a = valores médios diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ). b = valores médios diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as dietas do mesmo grupo.

A figura 4 mostra os efeitos da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade gliconeogênica a partir  $^{14}\text{C}$ -L-lactato em caranguejos alimentados com a dieta HP ou HC. Em normóxia, não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) da atividade gliconeogênica entre os caranguejos que receberam a dieta HP e aqueles mantidos com a dieta HC.

Em hipóxia, o grupo de caranguejos que recebeu a dieta HP aumentou 3 vezes ( $P < 0,05$ ) a atividade gliconeogênica em relação aos valores obtidos no grupo normóxia. Às 3 horas da fase de recuperação, a atividade gliconeogênica mantém valor semelhante aquele verificado na hipóxia. Contudo, às 24 horas de recuperação ocorreu uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da atividade gliconeogênica, porém os valores ainda foram 37% ( $p < 0,05$ ) maiores que aqueles verificados no grupo normóxia.

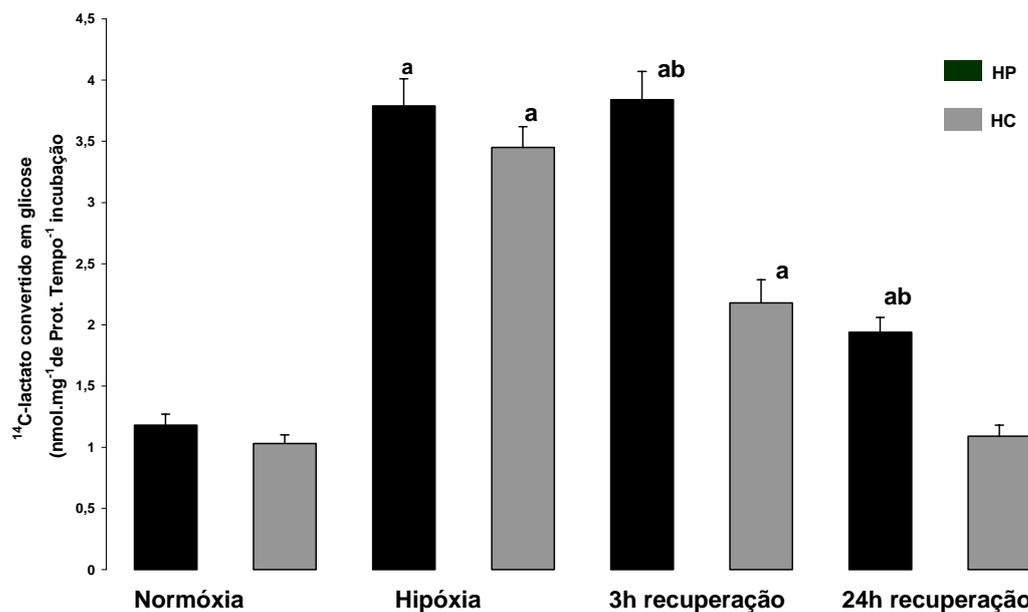


Figura 4. Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade gliconeogênica a partir  $^{14}\text{C}$  L-lactato no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* alimentado com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC). As colunas e as barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. a= valores médios diferentes do grupo controle ( $p < 0,05$ ). b= valores médios diferentes ( $p < 0,05$ ) entre as dietas do mesmo grupo.

Também nos caranguejos alimentados com a dieta HC, a hipóxia aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade gliconeogênica muscular. Contudo, após 3 horas em recuperação os valores de incorporação do  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose diminuíram cerca de 37% em relação àqueles verificados no grupo hipóxia. Após 24 horas em normóxia a capacidade de síntese de glicose retornou a valores semelhantes aqueles do grupo normóxia.

A figura 5 A mostra os efeitos da hipóxia e da recuperação sobre a atividade neoglicogeniogênica a partir  $^{14}\text{C}$  L-lactato. Em normóxia, não foi verificada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na incorporação de  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicogênio entre os caranguejos que receberam a dieta HP e àqueles mantidos com a dieta HC.

Tanto nos caranguejos que receberam a dieta HP como naqueles mantidos com a dieta HC, não foram verificadas variações significativas ( $p>0,05$ ) da atividade neoglicogeniogênica entre os grupos normóxia, hipóxia e recuperação de 3 horas. Entretanto, em ambos os grupos HP e HC, foi constatado um aumento significativo ( $P<0,05$ ) da atividade neoglicogeniogênica às 24 horas de recuperação quando comparado aos valores obtidos nos grupos normóxia, hipóxia e recuperação de 3 horas.

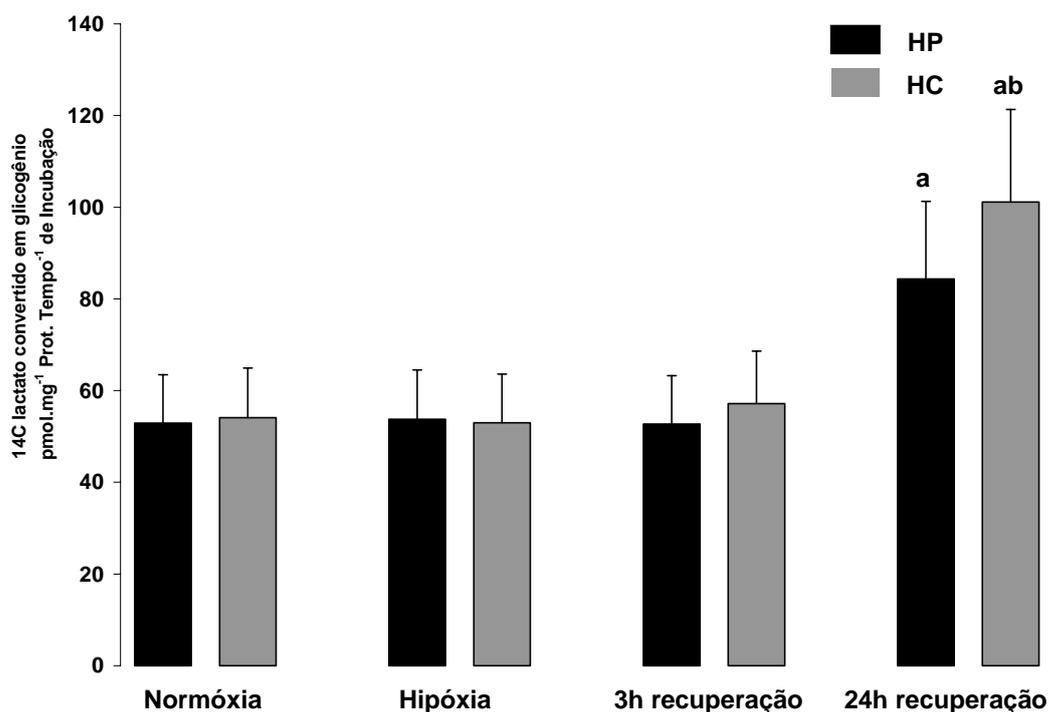


Figura 5. Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade neoglicogeniogênica a partir <sup>14</sup>C-lactato no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* alimentado com a dieta rica em proteínas (HP) ou carboidratos (HC). As colunas e as barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão da média. a= valores médios diferentes do grupo controle ( $p<0,05$ ). b= valores médios diferentes ( $p<0,05$ ) entre as dietas do mesmo grupo.

A tabela 3 mostra que a atividade da PEPCK no músculo dos caranguejos que receberam a dieta HP foi significativamente ( $p<0,05$ ) maior que aquela verificada no músculo do grupo HC. Durante a hipóxia a atividade da PEPCK aumentou significativamente ( $p<0,05$ ) em ambas dietas e a diferença significativa ( $p<0,05$ ) de atividade entre a dieta HP e HC foi mantida. Nos caranguejos que receberam a dieta

HP, os valores de atividade da PEPCK muscular mantiveram-se elevados até às 24 horas de recuperação. Entretanto, nos animais alimentados com a dieta HC, a atividade da PEPCK diminuiu ( $p < 0,05$ ) às 3 horas de recuperação, atingindo valores semelhantes àqueles verificados em normóxia às 24 horas pós-hipóxia.

Tabela 3- Efeito da hipóxia e da recuperação da hipóxia sobre a atividade da PEPCK muscular em caranguejos *Chasmagnathus granulata* alimentados com dietas ricas em proteínas (HP) ou em carboidratos (HC).

Atividade PEPCK ( $\mu\text{moles H}^{14}\text{CO}_3 \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína. $\text{min}^{-1}$ )		
	HP	HC
Normóxia	$170,38 \pm 4,21^b$	$159,18 \pm 5,32$
Hipóxia 8 horas	$195,84 \pm 6,06^{ab}$	$172,66 \pm 4,78^a$
Recuperação 3 horas	$200,73 \pm 6,06^{ab}$	$169,04 \pm 5,88^a$
24 horas	$204,17 \pm 4,06^{ab}$	$163,63 \pm 4,34$

Valores médios  $\pm$  desvio padrão da média

<sup>a</sup>Valores médios significativamente diferentes dos grupos controle ( $P < 0,05$ )

<sup>b</sup>Valores médios significativamente diferentes entre as dietas no mesmo grupo ( $P < 0,05$ )  
n=4

Em normóxia, os níveis de RNAm da PEPCK foram cerca de 50% ( $p < 0,05$ ) maiores nos caranguejos alimentados com a dieta HC que naqueles que receberam a dieta HP (Fig. 6 A e B). Nos animais submetidos durante 8 horas à hipóxia ambiental, somente no grupo HC a expressão da PEPCK aumentou 2 vezes ( $p < 0,05$ ) quando comparada aos valores obtidos em normóxia e 3 vezes ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo HP hipóxia (Fig. 6 A e B).

No grupo HP submetido às 3 horas de recuperação, os valores de RNAm da PEPCK aumentaram 2,6 vezes ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos normóxia e hipóxia.

Às 24 horas de recuperação os valores de RNAm da PEPCK diminuíram cerca de 50% em relação às 3 horas de recuperação, mas ainda permaneceram significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevados em relação àqueles verificados nos animais em normóxia (Fig. 6 A e B).

Já no grupo de animais que receberam a dieta HC, os valores de RNAm da PEPCK diminuíram drasticamente ( $p < 0,05$ ) durante a fase de recuperação da hipóxia, atingindo às 24 horas valores 97% ( $p < 0,05$ ) menores que àqueles verificados nos animais em normóxia (Fig. 7 A e B).

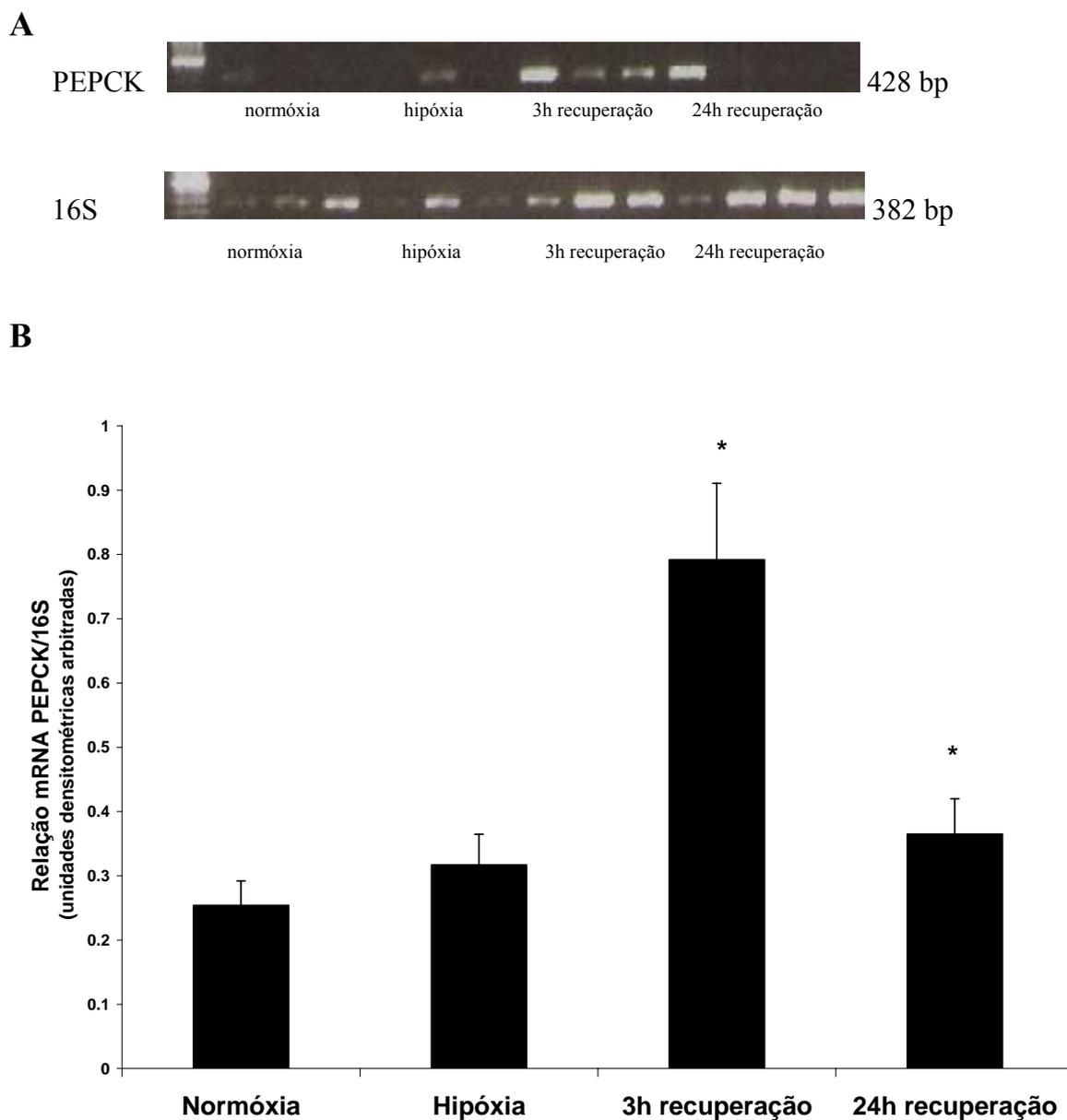


Figura 6- A: Gel representativo da expressão da PEPCK no músculo *Chasmagnathus granulata* alimentados com dietas ricas em proteínas. B: Análise densitométrica dos níveis da PEPCK mRNAs no músculo *Chasmagnathus granulata* alimentados com dietas ricas em proteínas, normalizados por valores 16S rRNA. \* Valores diferentes do grupo controle  $P < 0,05$ .

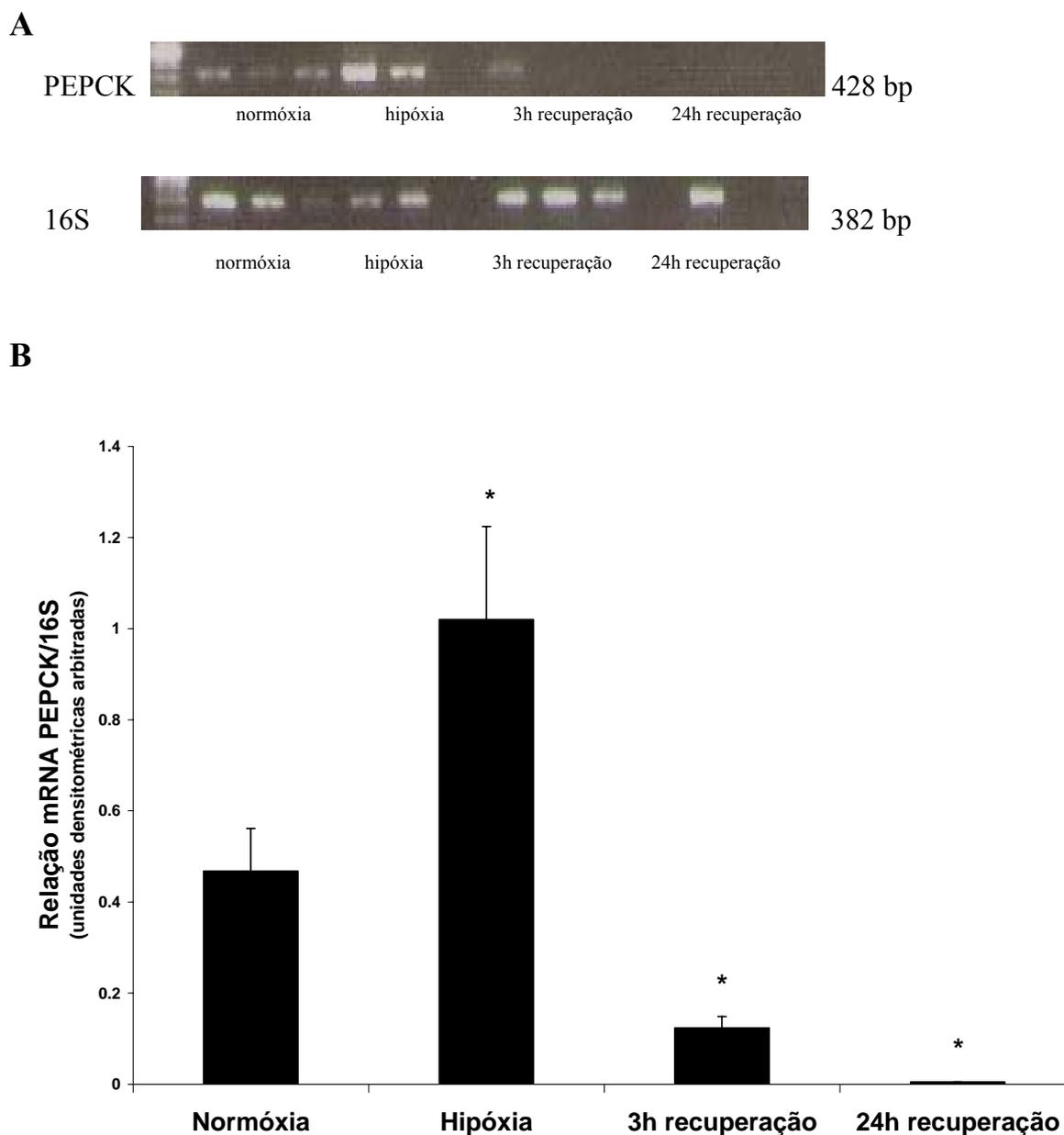


Figura 7- A: Gel representativo da expressão da PEPCK no músculo *Chasmagnathus granulata* alimentados com dietas ricas em carboidratos. B: Análise densitométrica dos níveis da PEPCK mRNAs no músculo *Chasmagnathus granulata* alimentados com dietas ricas em carboidratos, normalizados por valores 16S rRNA. \* Valores diferentes do grupo controle  $P < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

Em caranguejos normóxicos a relação lactato/glicose na hemolinfa foi de 4,9 e 15,6 em animais que receberam as dietas HP ou HC, respectivamente. Recentemente, Philp e cols. (2005) postulam que em vertebrados, o lactato não seria somente produzido durante as condições de hipóxia ou de anoxia, mas que seria também um produto metabólico durante uma oxigenação adequada. Os autores ainda sugerem que o lactato seria um metabólito ativo, movimentando-se entre células, tecidos e órgãos, onde ele pode ser oxidado como substrato energético ou reconvertido a piruvato ou glicose (Philp e cols., 2005). No presente trabalho, os elevados valores de lactato hemolinfático, verificados em *C. granulatus* em normóxica e que receberam a dieta HC, podem ser explicados pela alta atividade glicolítica muscular e pelos elevados teores de ATP verificados em músculo mandibular dos animais mantidos com a dieta HC por Marqueze e cols., 2006. Além disso, a oxidação de lactato no músculo dos caranguejos em normóxia, alimentados com a dieta HC, foi cerca de 50% menor que aquela verificada nos animais HP. Assim, em caranguejos em normóxia mantidos com a dieta HP, o lactato seria um metabólito ativo que pode ser oxidado como substrato energético em animais com baixa concentração de glicogênio muscular e de glicose na hemolinfa, como sugerido por Philp e cols. (2005) para vertebrados. A composição das dietas administradas aos caranguejos, não provocou diferença na excreção de lactato nos aquários.

Em *C. granulatus*, ficaram evidenciadas vias gliconeogênica e neoglicogeniogênica no músculo mandibular e sua participação no processo de regulação osmótica e no processo jejum-realimentação (Schein e cols., 2004; Pellegrino, 2006). Nos caranguejos em normóxia, os valores de incorporação do  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose ou em glicogênio no tecido muscular não apresentam diferenças entre os

animais que receberam a dieta HC ou HP. Entretanto, comparando-se a atividade e a expressão da enzima PEPCK, constatam-se diferenças entre os caranguejos que receberam a dieta HC e aqueles que foram alimentados com a dieta HP. Como em vertebrados, os caranguejos que receberam a dieta HP apresentaram a atividade da enzima PEPCK significativamente maior que aqueles alimentados com a dieta HC (Migliorini e cols., 1983; Suarez e Mommsen, 1987; Moon, 1988; Hanson e Reshef, 1997). Entretanto, estudando o efeito da composição da dieta sobre a atividade gliconeogênica a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato e de  $^{14}\text{C}$ -aminoácidos e a atividade da PEPCK no hepatopâncreas, Oliveira e Da Silva (1997) não verificaram diferenças entre os *C. granulatus* alimentados com a dieta HP e aqueles mantidos com a dieta HC.

Já os níveis de RNAm da PEPCK estão aumentados nos caranguejos alimentados com a dieta HC, quando comparados aos verificados nos animais HP. Schein e cols. (2004) demonstraram no músculo mandibular de *C. granulatus* que 90% da atividade da PEPCK é mitocondrial. Em vertebrados, a PEPCK mitocondrial hepática é expressa constitutivamente, não sendo controlada por hormônios ou pela composição da dieta (Hanson e Reshef, 1997; Panserat e cols., 2001). Passerat e cols. (2001) não constataram inibição na expressão da PEPCK em trutas alimentadas com uma dieta rica em carboidratos ou aumento de expressão em trutas em jejum, os autores explicam seus resultados pela presença no fígado deste animal de PEPCK somente expressa na isoforma mitocondrial. Entretanto, em *C. granulatus* a expressão da PEPCK aumentou significativamente no músculo mandibular de caranguejos submetidos ao estresse hiperosmótico (Schein e cols., 2004; 2005). Os resultados deste trabalho sugerem que em crustáceos, a PEPCK mitocondrial não seria constitutiva, já que sua expressão pode ser modulada pela composição da dieta ou pelo estresse osmótico.

Em músculo de *C. granulatus* a composição da dieta controlaria tanto a expressão como a atividade da PEPCK: a dieta HP aumentaria a atividade da enzima, já a dieta HC aumentaria os níveis de RNAm da PEPCK. Diversos autores sugerem que em vertebrados a gliconeogênese a partir do lactato ocorria em espécies que apresentam no fígado a isoforma mitocondrial da PEPCK, sugerindo ser um mecanismo adaptativo para o enfrentamento de altos níveis de lactato no organismo (Land e Hochachaka, 1993; Suarez e Momsen, 1987; Modaressi e cols., 1996). Land e Hochachka (1993) sugerem que a formação de piruvato a partir de lactato geraria NADH citosólica que equilibra a reação reversa de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH).

Como o *C. granulatus*, em seu habitat, enfrenta situações de hipóxia ou anoxia e variações marcantes de salinidade do meio, a presença de uma isoforma constitutiva da PEPCK não seria favorável à adaptação deste caranguejo ao meio estuarino.

Períodos de hipóxia fazem parte do ciclo biológico dos caranguejos *Chasmagnathus granulatus*, que em suas incursões ao meio terrestre, em busca de alimento ou abrigo nas tocas, permanecem por longos períodos fora da água.

Lutz e Storey (1997) sugerem que tanto vertebrados como invertebrados apresentam uma resposta bifásica à redução da concentração de O<sub>2</sub> ambiental. A primeira conduziria à ativação da via glicolítica para manter ou aumentar a produção de ATP, já que as vias de produção dependentes de O<sub>2</sub> estariam significativamente reduzidas. A segunda 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 como ocorre em tartarugas, caracóis terrestres e bivalves.

Em *C. granulatus* a sobrevivência após 12 horas de anoxia foi alta, cerca de 80% dos animais (Oliveira e cols., 2000). Nesta mesma espécie, Gonçalves (1993) observou um tempo letal médio (TL<sub>50</sub>) de 19h:45min, em animais submetidos por 30 horas à

anoxia ambiental. No presente trabalho, a sobrevivência após 8 horas de hipóxia foi de 100% nos dois grupos experimentais (HP e HC).

Em ambos os grupos experimentais (HP e HC), constatam-se um marcante aumento da concentração de lactato na hemolinfa após 8 horas de hipóxia. O aumento de lactato em situações de anoxia e de hipóxia foi verificado em outros crustáceos, sendo considerado o principal produto final da anaerobiose nesta classe de invertebrados (Zebe, 1982; Hill e cols., 1991; Hervant e cols., 1995; 1997 a;b, Zou *et al.*, 1996; Oliveira e cols., 2004). O lactato controlaria positivamente a liberação do CHH que aumentaria a concentração de glicose hemolinfática (Santos e Keller, 1993; Fanjul-Moles, 2006).

Em *C. granulatus* a diminuição do teor de oxigênio na água leva à ativação da via glicolítica no músculo e no hepatopâncreas, sendo que nos caranguejos alimentados com a dieta HP a capacidade de glicólise no músculo foi significativamente maior que nos caranguejos que receberam a dieta HC (Marqueze, 2004; Marqueze e cols., 2006). Em ambos os grupos experimentais (HC e HP), 8 horas de hipóxia reduzem marcadamente os níveis de glicogênio no músculo mandibular.

A menor velocidade de formação e de concentração de lactato, após 8 horas de hipóxia, verificada nos animais alimentados com a dieta HC, estaria associada a maior concentração de lactato hemolinfático em normóxia e a uma diminuição na atividade glicolítica muscular, como constatado por Marqueze e cols. (2005) em *C. granulatus*. Os autores verificaram neste caranguejo, que 1 hora em anoxia ambiental diminuiu a capacidade glicolítica no músculo mandibular quando comparada com aquela constatada em normóxia ou em animais alimentados com a dieta HP (Marqueze e cols., 2006). Contudo, a excreção de lactato, após 8 horas de hipóxia, foi semelhante entre os grupos experimentais (HP e HC), mas significativamente maior que aquela verificada

nos animais em normóxia. Diversos autores têm demonstrado uma diminuição de pH hemolinfático como resultado do aumento dos níveis de lactato durante a anaerobiose (Hill e cols., 1991; Taylor e Waldron, 1997; Bergmann e cols., 2001). Em *C. granulatus* alimentados com as dietas HC ou HP, o pH hemolinfático diminuiu significativamente após 1 hora em anoxia (HC=7,8 para 7,6; HP=8,0 a 7,7) (Marqueze, 2004). A eliminação direta de lactato no meio aquático foi verificada em diversos crustáceos (Van Aardt, 1988; Henry e cols., 1994; Hervant 1996; Hervant e cols., 1995; 1997). Assim, o aumento da excreção de lactato para o meio aquático em ambos os grupos experimentais (HP e HC) auxiliaria no controle da concentração de lactato circulante e de pH hemolinfático durante a hipóxia ambiental.

Em ambos grupos experimentais (HP e HC), a hipóxia ambiental durante 8 horas aumentou os valores de glicose na hemolinfa, sugerindo que a mobilização de glicose dos tecidos excede a sua utilização na via glicolítica, determinando o acúmulo de glicose circulante. Oliveira (1998) verificou em *C. granulatus* uma diminuição marcante nos níveis de glicose livre no hepatopâncreas, nas brânquias e no músculo após 8 horas de anoxia.

No presente trabalho, aumentos na incorporação de  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose e na atividade da enzima PEPCK no músculo mandibular foram constatados às 8 horas de hipóxia em ambos os grupos experimentais (HP e HC). Entretanto, nos animais alimentados com a dieta HC a expressão da PEPCK aumentou significativamente. Nos caranguejos que receberam a dieta HP, não foi necessário o aumento da expressão de PEPCK, somente sua atividade, em resposta a hipóxia ambiental de 8 horas. Também não foi verificada alteração na síntese de glicogênio a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato nestes caranguejos hipóxicos. Às 8 horas de hipóxia os valores de lactato e de glicose circulantes estão elevados, porém a concentração de glicogênio muscular diminuiu

marcadamente. Também nos caranguejos alimentados com a dieta HP, a formação de  $^{14}\text{CO}_2$  a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato decaiu significativamente.

O *C. granulatus* é uma espécie semiterrestre que vive nas zonas supra e mesolitorâneas dos estuários e enfrenta períodos de hipóxia quando exposto ao ar atmosférico. Durante a hipóxia, a regulação do equilíbrio ácido-básico via utilização do lactato na gliconeogênese pode ser um ajuste metabólico favorável para o *C. granulatus*, com o aproveitamento eficiente do ATP produzido. Também o *C. granulatus*, como outros crustáceos, poderia utilizar a alta concentração de arginina fosfato presente nos tecidos como fonte de  $\text{P}_i$  nos períodos de hipóxia, como foi observado no caranguejo *Gecarcoidea natalis* durante o exercício (Morris e Adamczewska, 2002). Oliveira e cols. (2004) também observaram um aumento da atividade gliconeogênica a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato no hepatopâncreas de *C. granulatus* após 2 e 8 horas de anoxia ambiental, contudo, neste órgão não houve um aumento da atividade da enzima PEPCK.

O processo de recuperação pós-hipóxia é de grande importância funcional, pois é durante a recuperação que as reservas de energia são restauradas e que os produtos finais acumulados são removidos do organismo.

Como em outros crustáceos, em *C. granulatus* o lactato desapareceu lentamente da hemolinfa durante o período de recuperação pós-hipóxia (Hill e cols., 1991; Hervant e cols., 1997; Morris e Adamczewska, 2002). Contudo, nos animais que receberam a dieta HP a restauração dos níveis de lactato hemolinfático ocorreu mais rapidamente que naqueles mantidos com a dieta HC. Às 24 horas de hipóxia, os caranguejos do grupo HC ainda apresentavam valores de lactato na hemolinfa 2 vezes maiores que aqueles verificados no grupo normóxia. A elevada capacidade gliconeogênica a partir de  $^{14}\text{C}$ -lactato, verificada às 3 e 24 horas de recuperação, seria um dos fatores que contribuíram para a restauração rápida dos valores de lactato hemolinfático nos

caranguejos que receberam a dieta HP. O aumento da capacidade gliconeogênica muscular foi sustentado por um aumento significativo na expressão e na atividade da enzima PEPCK às 3 e 24 horas de recuperação. Às 3 de recuperação, nos animais do grupo HP, a manutenção dos níveis de glicose cerca de 4 vezes maiores que aqueles verificados no grupo normóxia seria um reflexo da elevada atividade gliconeogênica constatada neste período experimental. Após 24 horas em normóxia, a redução da atividade gliconeogênica em relação aos valores de 3 horas de recuperação, provavelmente, contribuiu para o retorno dos valores de glicose a níveis semelhantes aqueles do grupo em normóxia nos caranguejos mantidos com a dieta HP.

Nos caranguejos que receberam a dieta HP, a oxidação de  $^{14}\text{C}$ -lactato no músculo não seria uma das rotas envolvidas na metabolização do lactato no período pós-hipóxia, pois os valores mantiveram-se reduzidos nos períodos de recuperação estudados. Contudo, a manutenção de elevada excreção de lactato para o meio externo (água), após 3 horas de recuperação, seria uma das estratégias utilizadas para eliminar o excesso de lactato produzido durante o período de hipóxia, pelos caranguejos que receberam a dieta HP.

Oliveira e cols. (2004) também constataram, em *C. granulatus* alimentados com a dieta HP, um aumento significativo na incorporação do  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose no hepatopâncreas de animais submetidos durante 8 horas à anoxia e após a recuperação por 12 ou 18 horas.

Assim, em *C. granulatus* alimentados com a dieta HP a gliconeogênese hepatopancreática e muscular seriam vias que estariam envolvidas na metabolização do lactato nos períodos pós-hipóxia ou anoxia. Hervant e cols. (1999) também sugerem a participação da via gliconeogênese na metabolização do lactato durante a recuperação pós-hipóxia em *Niphargus virei*.

No presente trabalho, constata-se que o retorno à normóxia diminui marcadamente a incorporação do  $^{14}\text{C}$ -lactato em glicose nos caranguejos mantidos com a dieta HC, quando comparada aos valores obtidos em hipóxia. Esta diminuição foi acompanhada pela redução na expressão e na atividade da PEPCK. Ao final do período experimental a expressão da PEPCK é significativamente menor e a atividade enzimática semelhante aos valores obtidos em normóxia. Estudando o efeito da anoxia e da fase de recuperação sobre a atividade gliconeogênica em hepatopâncreas de *C. granulatus* alimentados com a dieta HC, Oliveira e cols. (2004) concluíram que esta via não participava da metabolização do lactato no período pós-anóxico. Os resultados do presente trabalho e aqueles obtidos por Oliveira e cols. (2004) explicariam, em parte, a lenta diminuição dos valores de lactato hemolinfático verificados nos animais mantidos com a dieta HC, durante o período de recuperação pós-anóxico ou hipóxico. Também a oxidação de lactato foi reduzida com a volta dos animais à normóxia. Contudo, a excreção de lactato para o meio aquático seria uma via utilizada por este grupo para minimizar os altos valores deste metabólito na circulação.

Também, em ambos os grupos experimentais, pode ter ocorrido a incorporação do lactato em gordura ou em aminoácidos intracelulares, como verificado em outros crustáceos (Van Aardt e cols., 1988; Hill e cols., 1991; Henry e cols., 1994).

A via neoglicogeniogênica apresentou uma participação mais tardia na metabolização do lactato no período de recuperação. Em ambos os grupos experimentais, o aumento da atividade neoglicogeniogênica ocorreu somente às 24 horas de recuperação, contribuindo para a restauração dos valores de glicogênio muscular verificados às 24 horas de recuperação.

## 6. CONCLUSÕES

Em *C. granulatus* as concentrações de lactato hemolinfático dos animais em normóxia são elevadas e utilizadas como substrato energético em animais com níveis de glicose circulante e de glicogênio muscular reduzidos, como no grupo que recebeu a dieta HP. A dieta HC aumentou a expressão da enzima PEPCK no músculo, entretanto, a alimentação com uma dieta HP elevou a atividade desta enzima.

Em hipóxia, tanto nos animais alimentados com a dieta HC como naqueles mantidos com a dieta HP, a gliconeogênese muscular e a excreção do lactato para o meio aquático teriam uma participação marcante na regulação das concentrações de lactato circulante. A utilização destas vias teria como objetivo a manutenção do equilíbrio ácido-básico do organismo, durante o período de hipóxia. Em animais alimentados com a dieta HP o aumento da capacidade gliconeogênica ocorreu via aumento da atividade da PEPCK, entretanto, nos caranguejos que receberam a dieta HC foi estimulada a expressão da enzima.

Nos caranguejos que receberam a dieta HP, a gliconeogênese muscular participaria durante o processo de recuperação, da metabolização de lactato produzido durante o período de hipóxia. Esta participação ocorreu pelo aumento na atividade e na expressão da enzima PEPCK. Contrariamente, em caranguejos que receberam a dieta HC a reoxigenação inibe a capacidade gliconeogênica a partir de lactato, explicando, em parte, a mais lenta redução dos níveis de lactato circulante constatado neste grupo.

A neoglicogeniogênese teria, em ambos os grupos, uma participação mais tardia no processo de metabolização do lactato estimulando a reposição do glicogênio muscular. Também a excreção do lactato para o meio aquático foi mantida durante a recuperação.

Entretanto, em ambos os grupos experimentais, a oxidação de lactato no músculo não seria uma estratégia utilizada por este caranguejo para metabolizar o lactato nos períodos de recuperação. Ao contrário do que ocorre em vertebrados a atividade e a expressão da PEPCK na isoforma mitocondrial é controlada pelo teor de oxigênio no meio e pela composição da dieta administrada aos caranguejos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, S. J.; TAYLOR, A. C.; ATKINSON, J. A. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). **Comp. Biochem. Physiol.**, 108<sup>a</sup> (4): 515-522, 1994.

BAKER, N. Analysis of glucose-14C in tissues using thin-layer chromatography. **Analytical Biochemistry**, 10: 227-235, 1965.

BERGMANN, M.; TAYLOR, C.; GEOFFREY MOORE, P. Physiological stress in decapod crustaceans (*Munida rugosa* and *Liocarcinus depurator*) (discarded in the Clyde *Nephrops* fishery). **J. Exp Mar Biol Ecol** 259: 215-229, 2001.

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

BOSCHI, E. E. Los crustaceos decápodos brachyura del litoral Bonaerense. **Inst. Biol. Mar.** (Mar del Plata), 6: 1-76, 1964.

BOTTO J.L.; IRIGOYEN H.P. Bioecología de la comunidad Del cangrejal I. Contribucion al conocimiento biologico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulatus* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. **Seminario Latinoamericano en Ecología Biontica y Sedimentología de la Plataforma Continental del Atlantico Sur**, UNESCO, Montevideo, Uruguay, 161-169, 1980.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of quantities of protein utilizing of principle protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, V. 72: 248-254, 1976.

CHANG, E.; O' CONNORS, J. D. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss, D. E. (ed). The Biology of Crustacea. **Academic Press, New York**. P. 263-289, 1983.

CHANG, E. S. Chemistry of crustacean hormones that regulate growth and reproduction. In: Fingermann M.; Nagabhushanam, R.; Thompson, M.; F. (eds) Endocrinology and Reproduction Recent Advances in Marine Biotechnology vol. 1 **Science Publisher**, new Hampshire, USA, pp 163-178, 1987.

CHILDRESS, J.J.; SEIDEL, B.A. (1998) Life and stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. **J. Exp Biol** 201: 1223-1232, 1998.

CHITTÓ, A. L. Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. Master thesis. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre-RS, Brazil. 150 pp, (2000).

CHITTÓ, A. L. F.; KUCHARKI, L. C.; DA SILVA, R. S. M. Gluconeogenesis in gills of *Chasmagnathus granulatus* submitted to hyper-osmotic or hypo-osmotic stress in winter and Summer. **Seventh International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry**, Salvador, Bahia, Brazil, August 12–16, 2007. V.148, supplement 1, Pages S87-S88, 2007.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. **Analyt. Biochem.** 162, 156-159, 1987.

COOPER, A.W. Salt marshes In: Odum, H.T.; Copeland, B.J. and Macmahon, E.A. (eds), Coastal Ecological Systems of United States. **The Conservation Foundation**, Washinton D.C. V. II, P. 55-98, 1974.

CORSSMIT, E. P. M.; ROMIJN, J. A.; SAWERWEIN, H. P. Regulation of glucose production with special attention to non-classical regulatory mechanisms: a review. **Met. Clin. Exp.** v. 50: 742-755, 2001.

COURNARIE, F.; AZZOUT-MARNICHE, D.; FORETZ, M.; GUICHARD, C.; FERRE, P.; FOUFELLE, F. The inhibitory effect of glucose on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression in cultured hepatocytes is transcriptional and requires glucose metabolism. **FEBS Lett.** 460, 527-532, (1999).

CUESTA, J. A.; DIESEL, R.; SCHUBART, C.D. Re-examination of zoeal of morphology of *Chasmagnathus granulatus*, *Cyclograpsus lavauxi*, *Hemigrapsus sexdentatus*, and *H. Crenulatus* confirms consistent chaetotaxi in the Varunidae (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v. 74, n. 9, p. 895-912, 2001.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. 4 ed. Tradução de Iara M. Michelacci. São Paulo: editora Edgar Blücher, 2002.

D'INCAO, F.; RUFFINO, M. L.; SILVA, K. G.; BRAGA, A. C. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Atlântida**, 12 (2): 85-93, 1990.

DRACH, F.; TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la method de determination dès estates d' intermuda et son application generale aux crustsces. **Vie Milleu**, 161: 595-607, 1967.

FANJUL-MOLES, M. L. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. **Comp. Biochem. Physiol.** 142C,390 -400, 2006.

GONÇALVES, A. A. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (Crustácea: Decapoda: Grapsidae) durante a anoxia ambiental. Rio Grande: **FURG**, Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica), 1993.

HABOLD, C.; FOLTZER-JOURDAINNE, C.; LE MAHO, Y.; LIGNOT, J-H.; 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. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 581-611, 1997.
- HARTNOLL, R. G. Evolution, Systematics and Geographical Distribution. In: Burggren, W. and McMahon, B. (eds.) *Biology of Land Crabs*. **Cambridge University Press**, New York. P. 6-54, 1988.
- HENRY, R. P.; BOOTH, C.E.; ALALIER, F.; WALSH, P. Post-exercise lactate production and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.*, 186: 215-234, 1994.
- HERVANT, F.; MATHIEU, J.; GARIN, D.; FREMINET, 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* 68: 223-244, 1995.
- HERVANT, F. The activities of enzymes associated with intermediary and energy metabolism in hypogean and epigeal crustaceans. C. R. **Acad Sci Paris**, Sciences de la vie/ Life sciences, 319: 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**, Sciences de la vie/ Life sciences 320: 579-592, 1997.
- HERVANT F.; MATHIEU J.; GARIN D.; FRÉMINET A. Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. *J Exp Biology* 202: 579-592, 1999.
- 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.*, 150: 31-50, 1991.
- HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. Biochemical Adaptation. **Princeton University Press**, New Jersey. 538pp, 1984.
- HSU YUN-WEI, A.; DANIEL, I.; MESSINGER, J.; SOOK CHUNG; SIMON, G.; WEBSTER, H. O.; ANDREW E. Members of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) peptide family are differentially distributed both between and within the neuroendocrine organs of *Cancer* crabs: implications for differential release and pleiotropic function. *Journal of Experimental Biology* 209, 3241-3256, 2006.
- JOHNSTON, M. A.; ELDER, H. Y.; DAVIES, P. S. Cytology of *Carcinus* haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, 46A: 569-581, 1973.
- KEGEL, G.; REICHEWIEN, B.; WEESE S.; GAUS, G.; KATALINIC J. P.; KELLER, R. Aminoacids sequence of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) from the shore crab, *Carcinus maenas*. *FEBS Lett* 255: 10-14, 1989.

KELLER, R. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. **Experientia** 48: 439-448, 1992.

KINNE, R. K. H. The role of organic osmolytes in osmoregulation: from bacteria to mammals. **J. Exp. Zool.** 265: 346-355, 1993.

KRAUS-FRIEDMANN, N. K. Hormonal regulation of gluconeogenesis. **Physiol. Rev.** 64, 170-255, (1984).

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

LAND, S. C.; HOCHACHKA, P. W. Compartmentation of liver phosphoenolpyruvate carboxykinase in the aquatic turtle *Pseudemys scripta elegans* - a reassessment. **J. Exp. Biol.** 182, 271-273, 1993.

LE MOULLAC, G.; FLEURY, P.-G.; LE COZ, J.-R.; MOAL, J.; SAMAIN, J.-F. Effect of sediment nearness on the metabolic enzyme activity and energy state of the oyster *Crassostrea gigas* **Aquat. Living Resour.** 20: 279-286, 2007.

LUQUET, C. M.; ROSA, G. A.; FERRARI, C. C.; ENOVESE, G.; PELLERANO, G. N. Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. **Crustaceana**, v. 73, p. 53-67, 2000.

LUTZ, P.; STOREY, K.B. Adaptations to variations in oxygen tension by vertebrates and invertebrates. In W. H. Dantzler(ed.) **Comparative Animal Physiology**. Oxford University Press, New York, p. 1479-1522, 1997.

MANE-GAZON, F.; DEI-CAS, E.; SPECTOR, B. H.; LEYMONTE, J. Estudos sobre a biologia Del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851. I. Osmorregulation frente a cambios de la salinidad. **Physis, Seccion A**, 33 (86): 163-171, 1974.

MARKS, D. B.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M. **Basic Medical Biochemistry**. Baltimore: R. R. Donneley e Sons, 806p, 1996.

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

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

MIGLIORINI, R. H.; LINDER, C.; MOURA, J. L.; VEIGA, J. A. S. Gluconeogenesis in a carnivorous bird (black vulture). **Am. J. Physiol.** 225, 1389-1392, 1973.

MITHIEUX, G.; BADY, I.; GAUTIER, A.; CROSET, M.; RAJAS, F.; ZITOUN, C. Induction of control genes in intestinal gluconeogenesis is sequential during fasting and maximal in diabetes. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286, p. E370-375, 2004.

MODARESSI, S.; CHRIST, B.; BRATKE, J.; ZAHN, S.; HEISE, T.; JUNGERMANN, K. Molecular cloning, sequencing and expression of the cDNA of the mitochondrial form of phosphoenolpyruvate carboxykinase from human liver. **Biochem. J.** 315, 807-814, 1996.

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

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

NEWSHOLME, E. A.; LEECH, A. R. Carbohydrate metabolism in the liver. In **Biochemistry for the medical science** (ed. John Willey & Sons), pp. 442-480. Chichester: England, 1984.

ODUM, E. P. **Ecologia Interamericana** (ed), Rio de Janeiro, 435p. 1985.

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

OLIVEIRA, G. T. Metabolismo de Carboidratos em Caranguejos *Chamagnathus granulata* Alimentados com uma Dieta Rica em Carboidratos ou Proteínas e Submetidos a Diferentes Períodos de Anoxia Ambiental e de recuperação da Anoxia. (Doctoral Tesis). Porto Alegre, RS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 1998.

OLIVEIRA, G. T.; DA SILVA, R. S. M. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chamagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.** 127 B, 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. **Marine Biology** 139, n.2, p.335 – 342, 2001.

OLIVEIRA, G. T.; EICHLER, 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 A** 301: 240-289, 2004.

PANSERAT, S.; PLAGNES-JUAN, E.; BREQUE, J.; KAUSHIK, S. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.** 204, 359-365, 2001.

- PELLEGRINO, R. Efeito do jejum e da realimentação sobre a gliconeogênese e gliconeogeniogênese no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido previamente a dieta rica em proteínas ou carboidratos. (Máster Thesis) Porto Alegre, RS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2006.
- PHILP, A.; MACDONALD, A. L.; WATT, P. W. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. **Journal of Experimental Biology** 208: 4561-4575, 2005.
- PROSSER, C. L. **Environmental and metabolic animal physiology**. Wiley-Liss, New York, 109-165, 1991.
- 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 granulatus* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, 88A (1): 21-25, 1987.
- SANTOS, E. A.; KELLER, R. Effect of exposure to atmospheric air and blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). **Comp. Biochem. Physiol.**, 106A (2): 343-347, 1993.
- SCHEIN, V.; WHACHÉ, Y.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.,C.; WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R. M. S. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS letters** 561, 202-206, 2004.
- SCHEIN, V.; CHITTÓ, A. L. F.; ETGES, R.; KUCHARSKI, L.,C.; WORMHOUDT, A.; DA SILVA, R. M. S. Effect hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140B: 561-567, 2005B.
- SCOTT, D. K., O'DOHERTY, R. M., STAFFORD, J. M., NEWGARD, C. B. AND GRANNER, D. K. The repression of hormone-activated PEPCK gene expression by glucose is insulin-independent but requires glucose metabolism. **J. Biol. Chem.** 273, 24145-24151, 1998.
- SUAREZ, R. K.; MOMMSEN T. P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Can. J. Zool.** 65, 1869-1882, 1987.
- TAYLOR, H. H.; WALDRON, F. M. Respiratory responses to air-exposure in the southern rock lobster. *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda, Palinuridae). **Mar Freshwater Res** 48: 889-897, 1997.
- THABREW, M. I.; POAT, P. C.; MUNDAY, K. A. Carbohydrate metabolism in *Carcinus-maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.** 40 B, 531-541, 1971.
- TORRES, I. L. S.; CAMARO, C. D.; SILVEIRA-CUCO, S. N.; MICHALOWSKI, M. B.; CORRÊA, J. B.; PERRY, M. L. S.; DALMAZ, C. Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. **J. Med. Biol. Res.** 34: 111-116, 2001.

- TURCATO, G. S. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na lagoa de Tramandaí, RS, Brasil, Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas, ênfase em zoologia) 1990.
- VAN AARDT, W. J. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. **Comp. Biochem. Physiol.** 91 A, 299-304, 1988.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. **Anal Biochem** 11: 226-265, 1965.
- UDOMKIT, A.; SUPATTRA TREERATTRAKOL S.; PANYIM S. Crustacean hyperglycemic hormones of *Penaeus monodon*: cloning, production of active recombinant hormones and their expression in various shrimp tissues. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 298: 79-91, 2004.
- WACHTER, B. D.; SARTORIS, F. J.; PÖRTNER, H. O. The anaerobic endproduct lactate has behavioural and metabolic signalling function in the shore crab *Carcinus maenas*. **J Exp Biol** 200: 1015-1024, 1997.
- WAINWRIGHT, G.; WEBSTER, S. G.; WILKINSON, M. C.; CHUNG, J. S.; RESS, H. H. Structure and significance of mandibular organ –inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus* – involvement in multi-hormonal regulation of growth and reproduction. **J. Biol. Chem** 271: 12749-12754, 1996.
- WELDON, S. L., RANDO, A., MATATHIAS, A. S., HOD, Y., KALONICK, P. A., SAVON, S., COOK, J. S. AND HANSON, R. W. Mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase from the chicken - comparison of the cDNA and protein sequences with the cytosolic isozyme. **J. Biol. Chem.** 265, 7308-7317, 1990.
- WIESE, T. J.; LAMBETH, D. O.; RAY, P. D. The intracellular distributions and activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase isozymes in various tissues of several mammals and birds. **Comparative Biochemistry and Physiology** part B: Biochemistry and Molecular Biology. 100: 297-302, 1991.
- WOOD, C. M.; RANDALL, D. J. Haemolymph gas transport, acid-base regulation and anaerobic metabolism during exercise in the land crab (*Cardisoma carnifex*). **J. Exp. Zool** 218: 23-35, 1981.
- ZEBE, E. Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callinassa californiensis* (Crustacea, Thalassinidea). **Comp. Biochem. Physiol.**, 72B (4): 613-617, 1982.
- ZOU, E.; DU, N.; LAI, W. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of Chinese freshwater crab *Erioccheir sinenses* (Crustacea, Decapoda). **Comp Biochem Physiol** 114 A: 105-109, 1997.

**Lactate Metabolism in the Muscle of the Crab *Chasmagnathus granulatus*  
During Hypoxia and Post-Hypoxia Recovery**

José Eduardo S. Maciel, Fabiana Souza, Sandra Valle, Luiz Carlos Kucharski, Roselis  
Silveira Martins da Silva

Department of Physiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence to:

Dr. Roselis Silveira Martins da Silva  
Depto. de Fisiologia, ICBS, UFRGS  
Rua Sarmiento Leite, nº 500  
90.050-170 Porto Alegre, RS, Brazil  
Fax +55 51 33 08 31 66  
E-mail: [roselis@ufrgs.br](mailto:roselis@ufrgs.br)

**Abstract**

In *C. granulatus*, measurement of hemolymph lactate and glucose levels of fed animals in normoxia indicates a higher lactate/glucose ratio, suggesting that lactate is an important substrate for this crab. Since, periods of hypoxia are part of the biological cycle of this crab, and lactate is the main end product of anaerobiosis in this crab. Our hypothesis was that this lactate would be, therefore, used by gluconeogenic pathway or can be oxidized or excreted to the aquatic medium during hypoxia and post-hypoxia periods in *C. granulatus*.

The concentrations of hemolymphatic lactate in animals in normoxia are high, and are used as an energy substrate. In hypoxia, muscle gluconeogenesis and excretion of lactate to the aquatic medium would contribute significantly in regulating the concentration of circulating lactate. Utilization of these pathways would serve the objective of maintaining the acid-base equilibrium of the organism.

Muscle gluconeogenesis participates, during the recovery process, in metabolizing the lactate produced during the period of hypoxia. Lactate excretion to the external medium, was one of the strategies used to decrease the higher hemolymphatic lactate levels. However, oxidation of lactate in the muscle is not a strategy used by this crab to metabolize lactate in the recovery periods.

**Keywords:** Muscle, Gluconeogenesis, Lactate oxidation and excretion to water, Hypoxia and recovery

## 1. Introduction

The variation in oxygen content in the environment, which affects organisms directly or indirectly, is one of the main ecological parameters in areas such as estuaries, marshes, mangroves and coastal lakes. The capacity to tolerate variations in oxygen content in the environment is one of the prerequisites for the organisms in such habitats. *Chasmagnathus granulatus* is a semiterrestrial crab that lives in salt flats and marshes in neotropical estuaries of Brazil, from the coast of Rio de Janeiro to Rio Grande do Sul (Botto and Irigoyen, 1980). In its habitat, this crab constructs galleries or burrows with depths varying according to the level of the tides and groundwater, so that there is always water in the bottom of the burrow. These habitations have an important role in the ecophysiology of *C. granulatus*, because they minimize variations in salinity, temperature and dissolved oxygen of the water (Turcato, 1990). In the Tramandaí Lagoon in Rio Grande do Sul, where populations of *C. granulatus* are found in abundance, the animals undergo prolonged periods of hypoxia or anoxia, because the concentration of dissolved oxygen in the water can vary from 2.80 mg O<sub>2</sub>/L to 11.78 mg O<sub>2</sub>/L, and can reach near zero in winter when the animal closes its burrow (Turcato, 1990).

The most important biochemical adaptations that contribute to survival in anaerobiosis include: 1) maintenance of high reserves of fermentable fuel such as glycogen; 2) mechanisms to minimize metabolic acidosis by means of enhanced buffering capacity, compensatory ion changes, or alteration of the type of end product produced; 3) the use of alternative pathways of fermentative ATP production to enhance anaerobic ATP yield; and 4) depression of the metabolic rate (Hervant et al., 1995; Childress et al., 1998).

Lactate is the main end product of anaerobiosis in crustaceans; however, its fate in the period of recovery from hypoxia or anoxia – oxidation, synthesis of glucogen or

glucose and excretion – is controversial (Gade, 1984; Lallier et al., 1987; Aardt and Wolmarans, 1987; Van Aardt, 1987; Hill et al., 1991; Santos and Keller, 1993; Henry et al., 1994; Anderson et al., 1994; Hervant et al., 1997; Spicer et al., 2002).

In *C. granulatus* maintained on a diet rich in carbohydrates or proteins and submitted to environmental anoxia for 8 hours, the concentrations of lactate and glucose in the hemolymph increased 10-14 times compared to the groups in normoxia (Oliveira et al., 2004). During recovery from anoxia, the concentration of lactate in the hemolymph of crabs fed a carbohydrate-rich diet returned more rapidly to levels similar to that of the normoxia group, compared to that in crabs fed a protein-rich diet (Oliveira et al., 2004). This decrease in hemolymph lactate was accompanied by an increase in the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -lactate into  $^{14}\text{C}$ -glucose and in the activity of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) in the hepatopancreas of the crabs fed the carbohydrate-rich diet (Oliveira et al., 2003).

Recently, Marqueze et al. (2006) showed that 1 h in anoxia increased pyruvate kinase activity and ATP concentration and reduced glycogen concentration and  $^{14}\text{CO}_2$  production from  $^{14}\text{C}$ -lactate in jaw muscle from *C. granulatus* maintained on a carbohydrate-rich diet. In crabs maintained on a high-protein diet, pyruvate kinase activity decreased after 1 h in anoxia,  $^{14}\text{CO}_2$  production from  $^{14}\text{C}$ -glucose increased, and  $^{14}\text{CO}_2$  production from  $^{14}\text{C}$ -lactate did not change. During recovery, a low oxidation capacity for lactate was found in jaw muscle of both dietary groups. Pyruvate kinase activity and  $^{14}\text{CO}_2$  production from  $^{14}\text{C}$ -glucose were high during the recovery period only in jaw muscle from crabs maintained on a high-protein diet (Marqueze et al., 2006). In contrast, recovery decreased ATP concentration in jaw muscle of both dietary groups compared to anoxia and normoxia, and did not restore glycogen concentration in this tissue (Marqueze et al., 2006).

In *C. granulatus*, measurement of hemolymph lactate and glucose levels of fed animals in normoxia indicates a higher lactate/glucose ratio (mmol/L / mmol/L), suggesting that lactate is an important substrate for this crab (Pellegrino et al., 2007). Since, periods of hypoxia are part of the biological cycle of *Chasmagnathus granulatus* crabs, and lactate is the main end product of anaerobiosis in this crab. Our hypothesis was that this lactate would be, therefore, used by gluconeogenic pathway or can be oxidized or excreted to the aquatic medium during hypoxia and post-hypoxia periods in *C. granulatus*.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Animals*

We used male *Chasmagnathus granulatus* crabs in intermolt stage C and weighing between 15 and 17 g, collected in the Tramandaí Lagoon, Rio Grande do Sul. In the laboratory, the animals were kept for 10 days in aerated aquaria (18.95% dissolved O<sub>2</sub> in the water), salinity 20‰, temperature 25°C and a natural light/dark cycle.

### *2.2. Experimental Procedure*

After the 10 days of acclimation in the laboratory, the animals were transferred to aquaria where they were provided with the experimental diet of raw beef for 15 days.

For the study of hypoxia, 20-L aquaria with 4.5% O<sub>2</sub> were used. The reduction in oxygen level was obtained by aerating the water in the aquaria with nitrogen gas and monitoring with an oxygen meter (World Precision Instruments model Oxel-1/ISO<sub>2</sub>). When the oxygen content in the water reached 4.5%, 12 animals were placed in each aquarium and these were sealed. The crabs remained in hypoxia for 8 hours. Next, these animals were used for the experiments (hypoxia group) and the other crabs were returned to water containing 18.95% dissolved O<sub>2</sub>. The control group was maintained in normoxia

during the entire experimental period. At the end of the experimental periods, the animals were immediately cryoanesthetized for 5 min, and samples of mandible muscle were collected and used in the different experimental protocols. The hemolymph of these animals was collected from the joints of the 4th and 5th pereopods, using 10% potassium oxalate as an anticoagulant, and used for the biochemical determinations of glucose and lactate. The excised mandible muscles were placed in Petri dishes cooled on ice and containing a physiological solution (SFC) for *C. granulatus* [300 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 8.8 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, plus 10 mM HEPES and 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.8].

### 2.3. Gluconeogenesis

For evaluation of the gluconeogenic capacity, the tissues ( $50 \pm 2$  mg) were incubated in 500  $\mu$ l SFC in the presence of 0.2  $\mu$ Ci [U-<sup>14</sup>C] L-lactate (157 mCi/mmol Amersham International) plus 15 mM L-lactate, at 25°C with constant shaking for 120 minutes, according to the technique described by Oliveira and Da Silva (1997). After the incubation time had elapsed, the tissue reactions were stopped in an ice bath, and the tissues removed. The incubation medium was centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, and the supernatant was deproteinized with saturated Ba(OH)<sub>2</sub> and 2% ZnSO<sub>4</sub> and centrifuged again for 10 minutes at 3000 rpm. The supernatant resulting from this centrifugation was used for determination of the <sup>14</sup>C-glucose formed from <sup>14</sup>C-lactate and released into the incubation medium.

The <sup>14</sup>C-glucose was determined by thin-layer chromatography, according to the method described by Backer et al. (1965). As the carrying solution, n-butanol, 95% ethyl alcohol and 5.4% acetic acid in the proportions of 250:158:92 (v/v/v) was used. The spots were revealed with a solution of 95% ethyl alcohol, concentrated sulfuric acid and

anisaldehyde in the proportion of 18:1:1 (v/v/v), and were then scraped and placed directly into vials containing 0.4% toluene-tritonX100 (2:1, v/v) -PPO and 0.01% POPOP, and the radioactivity was measured in a LKB-Wallac counter with 97% efficiency. Gluconeogenic activity was measured by the incorporation of  $^{14}\text{C}$  from L-lactate into glucose in the incubation medium. The gluconeogenic activity was expressed in nmoles  $^{14}\text{C}$ -L-lactate converted to glucose.  $\text{g}^{-1}$  tissue.  $\text{h}^{-1}$  incubation.

#### 2.4. Formation of $^{14}\text{CO}_2$

For production of  $^{14}\text{CO}_2$ , the jaw muscles samples ( $50 \pm 2$  mg) were incubated in flasks with 1 ml SFC containing 0.2  $\mu\text{Ci}$  [ $\text{U-}^{14}\text{C}$ ] L-lactate (157 mCi/mmol, Amersham International) plus 10 mM L-lactate. The sealed flasks were incubated at 25°C, with constant shaking, for 60 minutes. 3MM Whatman papers were placed into glass wells inserted in the rubber stoppers of the flasks. During the incubation, the wells remained above the incubation medium. Production of  $^{14}\text{CO}_2$  was interrupted by injection of 0.2 ml 50% TCA into the SFC and 0.2 ml of 2M sodium hydroxide into the wells, through the rubber stopper. The sealed flasks remained at room temperature overnight, after which the wells with the paper were placed in vials containing tolueno-triton X100 (2:1, v/v)- PPO 0.4%, POPOP 0.01% and the radioactivity was measured in an LKB-Wallac counter with 97% efficiency (Torres et al., 2001). The values of  $^{14}\text{CO}_2$  production were expressed in nmol of  $^{14}\text{C}$ -L-lactate converted to  $^{14}\text{CO}_2$ .  $\text{g}^{-1}$  tissue.  $\text{h}^{-1}$  incubation.

### *2.5. Biochemical Determinations*

The concentration of lactate in the hemolymph and in the water of the aquaria was determined with a Boehringer kit (No. 139.084). The results were expressed in mmol lactic acid per liter.

The glucose concentration was determined by the glucose oxidase method with a Labtest Enz-color kit. The results were expressed in mmol glucose per liter.

Muscle glycogen was extracted by the method of Van Handel (1965), and after acid hydrolysis was determined as glucose. The results were expressed as g% of glycogen.

### *2.6. Statistical Analysis*

The animals were divided into four groups: control, 8 hours of hypoxia, 3 hours of recovery and 24 hours of recovery. For the statistical analysis, a one-way ANOVA with Tukey's test for comparison were used. The significance criterion adopted was  $P < 0.05$ . All tests were carried out using the statistics program BioEstat 3.0.

## **3. Results**

After 8 hours of hypoxia, levels of glucose in the hemolymph increased 12 times ( $p < 0.01$ ) compared to those observed in normoxia. In the crabs allowed 3 hours of recovery, hemolymph glucose levels decreased 66% ( $p < 0.05$ ) in relation to the hypoxia group; however, the glucose levels were higher ( $p < 0.05$ ) than those observed in the normoxia group. After 24 hours of recovery, hemolymph glucose levels returned to values similar to those observed in the normoxia group (Table 1).

Hypoxia for 8 hours increased 12-fold ( $p < 0.05$ ) the lactate concentration in the hemolymph, compared to the values obtained in the normoxia group. After 3 hours of recovery, hemolymph lactate levels remained high (about 10 times;  $p < 0.05$ ) in relation to

the normoxia group. However, at 24 hours of recovery, hemolymph lactate levels reached levels similar to those observed in the normoxia group (Table 1).

After 8 hours in hypoxia there was an 8-fold increase ( $p < 0.05$ ) in lactate concentration in the water of the aquaria, which continued after 3 hours of recovery. At the end of the experimental period (24 hours of recovery), hemolymph lactate levels reached values similar to those observed in the group in normoxia (Table 2).

The concentration of muscle glycogen in the hypoxia group decreased 64% ( $p < 0.05$ ) compared to that observed in the normoxia group. At 3 hours of recovery, the concentration of muscle glycogen reached a similar level to that observed in the hypoxia group. After 24 hours in recovery, the glycogen levels were similar to those observed in the normoxia group (Fig. 1).

The production of  $^{14}\text{CO}_2$  from  $^{14}\text{C}$ -lactate decreased about 2-fold ( $p < 0.05$ ) during hypoxia, compared to that observed in the normoxia group. After 3 and 24 hours in recovery, the values of  $^{14}\text{CO}_2$  production were similar to those observed in the hypoxia group, and significantly ( $p < 0.05$ ) lower than those observed in the normoxia group (Fig. 2).

In hypoxia, gluconeogenic activity increased 3-fold ( $P < 0.05$ ) in relation to the values obtained in the normoxia group. At 3 hours of the recovery phase, gluconeogenic activity was similar to that observed in hypoxia. However, at 24 hours of recovery there was a significant decrease ( $P < 0.05$ ) in gluconeogenic activity, although the levels were still 37% ( $p < 0.05$ ) higher than those observed in the normoxia group (Fig. 3).

#### 4. Discussion

The present study showed that the lactate/glucose ratio in the hemolymph of crabs maintained in 18-95% dissolved O<sub>2</sub> in water (normoxia) was 4.9. This result suggests that lactate is not only a product of anoxia or hypoxia in *C. granulatus*, but that it also has a function as an energy substrate in conditions of normoxia. Recently, Philp et al. (2005) postulated that in vertebrates, lactate is not only produced during conditions of hypoxia or anoxia, but that it is also a metabolic product under conditions of adequate oxygenation. The authors also suggested that lactate is an active metabolite, moving among cells, tissues and organs, where it can be oxidized as an energy substrate or reconverted to pyruvate or glucose (Philp et al., 2005). The results of the present study show that in normoxia, lactate is used by the crab muscle as an energy substrate. Also, excretion of lactate to the aquatic medium is another pathway used by this crab to regulate hemolymph lactate levels under conditions of adequate oxygenation.

Periods of hypoxia are part of the biological cycle of *Chasmagnathus granulatus* crabs, which remain out of water for long periods during their excursions into the terrestrial environment in search of food or shelter in their burrows.

In *C. granulatus*, survival after 12 hours of anoxia was high, about 80% of the animals (Oliveira et al., 2000). In the same species, Gonçalves (1993) observed a mean lethal time (TL<sub>50</sub>) of 19 h: 45 min in animals after 30 hours of environmental anoxia. In the present study, after 8 hours in hypoxia, survival was 100%.

A marked increase in hemolymph lactate concentration was observed following hypoxia, which was accompanied by a marked reduction in the formation of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from <sup>14</sup>C-lactate and of the glycogen levels in the muscle.

Environmental hypoxia for 8 hours also increased hemolymph glucose levels, suggesting that glucose is mobilized in the tissues in excess of its utilization in the

glycolytic pathway, leading to accumulation of circulating glucose. Oliveira (1998) observed in *C. granulatus* a marked reduction in levels of free glucose in the hepatopancreas, gills and muscle after 8 hours of anoxia.

The increase of lactate in situations of anoxia and hypoxia has been observed in other crustaceans, and lactate is considered the main end product of anaerobiosis in this class of invertebrates (Zebe, 1982; Hill et al., 1991; Hervant et al., 1995; 1997 a;b, Zou et al., 1996; Oliveira et al., 2004). Lactate positively controls the release of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), which increases hemolymph glucose concentration (Santos and Keller, 1993; Fanjul-Moles, 2006). This glucose would be utilized through the glycolytic pathway to generate ATP. In *C. granulatus* the reduction in oxygen in the water leads to activation of the glycolytic pathway in the muscle and hepatopancreas (Marqueze, 2004; Marqueze et al., 2006).

Several investigators have demonstrated a reduction in hemolymph pH as a result of increase in lactate levels during anaerobiosis (Hill et al., 1991; Taylor and Waldron, 1997; Bergmann et al., 2001). In *C. granulatus*, the pH of the hemolymph decreased significantly after 1 hour in anoxia (pH=8.0 to pH=7.7) (Marqueze, 2004). Thus, the increase in lactate excretion to the aquatic medium, observed in the present study, would help to control the concentration of circulating lactate and the hemolymph pH during environmental hypoxia. Direct elimination of lactate into the aquatic medium has been observed in several species of crustaceans (Van Aardt, 1988; Henry et al., 1994; Hervant, 1996; Hervant et al., 1995; 1997).

In the present study, a marked increase in the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -lactate into glucose was observed in the jaw muscle at 8 hours of hypoxia. *C. granulatus* is a semiterrestrial species that lives in the upper- and midlittoral zones of estuaries and undergoes periods of hypoxia when it is exposed to atmospheric air. During hypoxia,

regulation of the acid-base equilibrium via utilization of high levels of lactate in gluconeogenesis can be a favorable metabolic adjustment for *C. granulatus*, with the efficient use of the ATP produced. Also *C. granulatus*, like other crustaceans, can use the high concentration of arginine phosphate present in its tissues as a source of energy during periods of hypoxia, as observed in the crab *Gecarcoidea natalis* during exercise (Morris and Adamczewska, 2002). Oliveira et al. (2004) also observed an increase in gluconeogenic activity from  $^{14}\text{C}$ -lactate in the hepatopancreas of *C. granulatus* after 2 and 8 hours of environmental anoxia.

The process of post-hypoxia recovery is of great functional importance, because it is during recovery that energy reserves are restored and the accumulated end products are removed from the organisms.

As in other crustaceans, in *C. granulatus* lactate disappeared slowly from the hemolymph during the post-hypoxia recovery period (Hill et al., 1991; Hervant et al., 1997; Morris and Adamczewska, 2002). The high gluconeogenic capacity from  $^{14}\text{C}$ -lactate, observed at 3 and 24 hours of recovery, is one of the factors that contributed to the rapid restoration of hemolymph lactate levels. At 3 hours of recovery, the maintenance of glucose levels about 4 times higher than those observed in the normoxia group would be a result of the increased gluconeogenic activity observed in this experimental period. After 24 hours in normoxia, the reduction of gluconeogenic activity in relation to the levels seen at 3 hours of recovery probably contributed to the restoration of glucose levels to concentrations similar to those of the group in normoxia.

Oxidation of  $^{14}\text{C}$ -lactate in the muscle was not among the routes involved in the metabolization of lactate in the post-hypoxia period, because the levels remained low in the recovery periods studied. However, the maintenance of a high rate of lactate

excretion to the external medium (water), after 3 hours of recovery, would be one of the strategies used to eliminate the excess lactate produced during the period of hypoxia.

Oliveira et al. (2004) also observed, in *C. granulatus*, a significant increase in the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -lactate into glucose in the hepatopancreas of animals that underwent 8 hours of anoxia and after recovery for 12 or 18 hours.

Thus, in *C. granulatus*, hepatopancreatic and muscle gluconeogenesis are pathways involved in lactate metabolism in the post-hypoxia or anoxia periods. Hervant et al. (1999) also suggested that the gluconeogenesis pathway participates in lactate metabolism during post-hypoxia recovery in *Niphargus virei*.

We cannot discard the hypothesis that  $^{14}\text{C}$ -lactate is incorporated into fat or intracellular amino acids, as observed in other crustaceans (Van Aardt et al., 1988; Hill et al., 1991; Henry et al., 1994).

In conclusion, in *C. granulatus* the concentrations of hemolymphatic lactate in animals in normoxia are high, and are used as an energy substrate. In hypoxia, muscle gluconeogenesis and excretion of lactate to the aquatic medium would contribute significantly in regulating the concentration of circulating lactate. The utilization of these pathways would serve the objective of maintaining the acid-base equilibrium of the organisms, during the period of hypoxia.

Muscle gluconeogenesis participates, during the recovery process, in metabolizing the lactate produced during the period of hypoxia. Also, lactate excretion to the external medium (water), was one of the strategies used to decrease the higher hemolymphatic lactate levels. However, oxidation of lactate in the muscle is not a strategy used by this crab to metabolize lactate in the recovery periods.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. R.S.M.S. and L.C.K. are CNPq fellows.

## References

- Anderson, S. J.; Taylor, A. C.; Atkinson, J. A., 1994. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.*, 108 A, 515-522.
- Bergmann, M.; Taylor, C.; Moore, P.G., 2001. Physiological stress in decapod crustaceans (*Munida rugosa* and *Liocarcinus depurator*) (discarded in the Clyde *Nephrops* fishery). *J. Exp Mar Biol Ecol* 259, 215-229.
- Botto, J.L.; Irigoyen H.P., 1980. Bioecologia de la comunidad Del cangrejal I. Contribuicion al conocimiento biologico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulatus* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. Seminario Latinoamericano en Ecologia Bentonica y Sedimentologia de la Plataforma Continental del Atlantico Sur, UNESCO, Montevideo, Uruguay, 161-169.
- Childress, J.J.; Seidel, B.A., 1998. Life and stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J. Exp Biol* 201, 1223-1232.
- Fanjul-Moles, M. L., 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: review and update. *Comp. Biochem. Physiol.* 142C, 390 -400.
- Gäde G., 1984. Effects of oxygen deprivation during anoxia muscular work on the energy metabolism of the crayfish, *Orconctes limosus*. *Comp Biochem Physiol* 77 A, 492-502.
- Gonçalves, A. A., 1993. Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) (Crustácea: Decapoda: Grapsidae) durante a anoxia ambiental. Rio Grande: FURG, Monografia (Curso de Graduação em Oceanografia Biológica).
- Henry, R. P.; Booth, C.E.; Lalier, F.; Walsh, P., 1994. Post-exercise lactate prodtion and metabolism in three species of aquatic and terrestrial decapod crustaceans. *J. Exp. Biol.* 186, 215-234.
- Hervant, F.; Mathieu, J.; Garin, D.; Freminet, A., 1995. Beavioral, ventilatory, and metabolic responses to severe hypoxia and subsequent recovery of the hypogean *Niphargus rhenorhodanensis* and epigean *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Physiol Zool* 68, 223-244.

- Hervant, F., 1996. The activities of enzymes associated with intermediary and energy metabolism in hypogean and epigean crustaceans. C. R. Acad Sci Paris, Sciences de la vie/ Life sciences, 319, 1071-1077.
- Hervant, F.; Mathieu, J.; Messana, G., 1997. Locomotory, ventilatory and metabolic responses of the subterranean *Stenasellus virei* (Crustacea, Isopoda) to severe hypoxia and subsequent recovery. C. R. Acad Sci Paris, Sciences de la vie/ Life sciences 320, 579-592.
- Hervant F.; Mathieu J.; Garin D.; Fréminet A., 1999. Lactate metabolism and glucose turnover in the subterranean crustacean *Niphargus virei* during post-hypoxic recovery. J Exp Biology 202, 579-592.
- Hill, A.D.; Taylor, A.C.; Strang, R.H.C., 1991. Physiological and metabolic responses of shore crab *Carcinus maenas* (L.) during environmental anoxia and subsequent recovery. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 150, 31-50.
- Lallier, F.; Truchot, J.P., 1997. The effect of ambient oxygen and temperature on haemolymph L-lactate and urate concentration in the shore crab *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol. 86 A, 255-260.
- Marqueze A., 2004. Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos *C. granulatus* mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas. (Doctoral Tesis). Porto Alegre, RS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.
- Marqueze A.; Kucharski L.C.; Da Silva R.M.S., 2006. Effects of anoxia and post-anoxia recovery on carbohydrate metabolism in the jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets. J Exp Mar Biol Ecol 332, 198-205.
- Morris, S.; Adamczewska, A., 2002. Utilization of glycogen, ATP and arginine phosphate in exercise and recovery in terrestrial red crabs, *Gecarcoidea natalis*. Comp Biochem Physiol 133 A, 813-825.
- Oliveira, G. T.; Da Silva, R. S. M., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp. Biochem. Physiol. 118 A, 1429-1435.
- Oliveira, G. T., 1998. Metabolismo de Carboidratos em Caranguejos *Chasmagnathus granulata* Alimentados com uma Dieta Rica em Carboidratos ou Proteínas e Submetidos a Diferentes Períodos de Anoxia Ambiental e de recuperação da Anoxia. (Doctoral Tesis). Porto Alegre, RS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Oliveira, G. T., Da Silva, R. S. M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp. Biochem. Physiol. 127 B, 375-381.

- Oliveira, G. T., Eichler, P., Rossi, I. C., Da Silva, R. S. M., 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high protein or carbohydrate rich diets. *J Exp Zool A* 301, 240-289.
- Pellegrino, R., 2006. Efeito do jejum e da realimentação sobre a gliconeogênese e gliconeogeniogênese no músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* submetido previamente a dieta rica em proteínas ou carboidratos. (Máster Thesis) Porto Alegre, RS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Philp, A.; Macdonald, A. L.; Watt, P. W., 2005. Lactate – a signal coordinating cell and systemic **function**. *Journal of Experimental Biology* 208, 4561-4575.
- Santos, E. A.; Keller, R., 1993. Effect of exposure to atmospheric air and blood glucose and lactate concentrations in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106A, 343-347.
- Spicer J.L., Dando C.L. Maltby L., 2002. Anaerobic capacity of crustacean sensitive to low environmental oxygen tensions, the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Hidrobiologia* 477, 189-194.
- Taylor, H. H.; Waldron, F. M., 1997. Respiratory responses to air-exposure in the southern rock lobster. *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda, Palinuridae). *Mar Freshwater Res* 48, 889-897.
- Turcato, G. S., 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulatus* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na lagoa de Tramandaí, RS, Brasil, Porto Alegre: UFRGS. Dissertação.
- Van Aardt, W.; Wolmarans, C., 1987. Effects of anoxia on the haemolymph an lactate accumulations in freshwater crac, *Potamon warreni*. *Comp. Biochem. Physiol.* 88A, 671-675.
- Van Aardt, W. J., 1988. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamon warreni*. *Calm*, during anoxia and subsequent recovery. *Comp. Biochem. Physiol.* 91 A, 299-304.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of glycogen in small amount of soft tissue. *Anal Biochem* 11, 226-265.
- Zebe, E., 1982. Anaerobic metabolism in *Upogebia pugettensis* and *Callinassa californiensis* (Crustacea, Thalassinidea). *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B, 613-617.
- Zou, E.; Du, N.; Lai, W., 1997. The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of Chinese freshwater crab *Erioccheir sinenses* (Crustacea, Decapoda). *Comp Biochem Physiol* 114 A, 105-109.

**Figure captions**

**Fig.1.** Effect of hypoxia and post-hypoxia recovery on glycogen concentration in jaw muscle from *C. granulatus*. Data are given as means  $\pm$  S.D. Number of crabs = 4 in each case. (a) indicate significantly different from the normoxia group.

**Fig.2.** Effect of hypoxia and post-hypoxia recovery on  $^{14}\text{C}$ -lactate oxidation in jaw muscle from *C. granulatus*. Data are given as means  $\pm$  S.D. Number of crabs = 4 in each case. (a) indicate significantly different from the normoxia group.

**Fig.3.** Effect of hypoxia and post-hypoxia recovery on gluconeogenic activity from  $^{14}\text{C}$ -lactate in jaw muscle from *C. granulatus*. Data are given as means  $\pm$  S.D. Number of crabs = 4 in each case. (a) indicate significantly different from the normoxia group.

Fig. 1

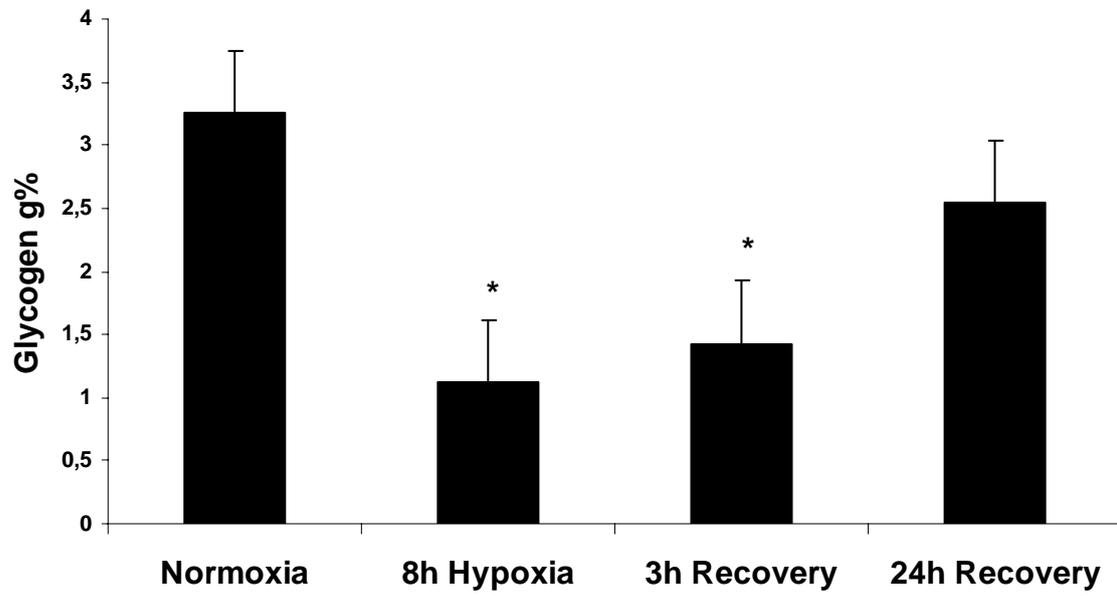


Fig. 2

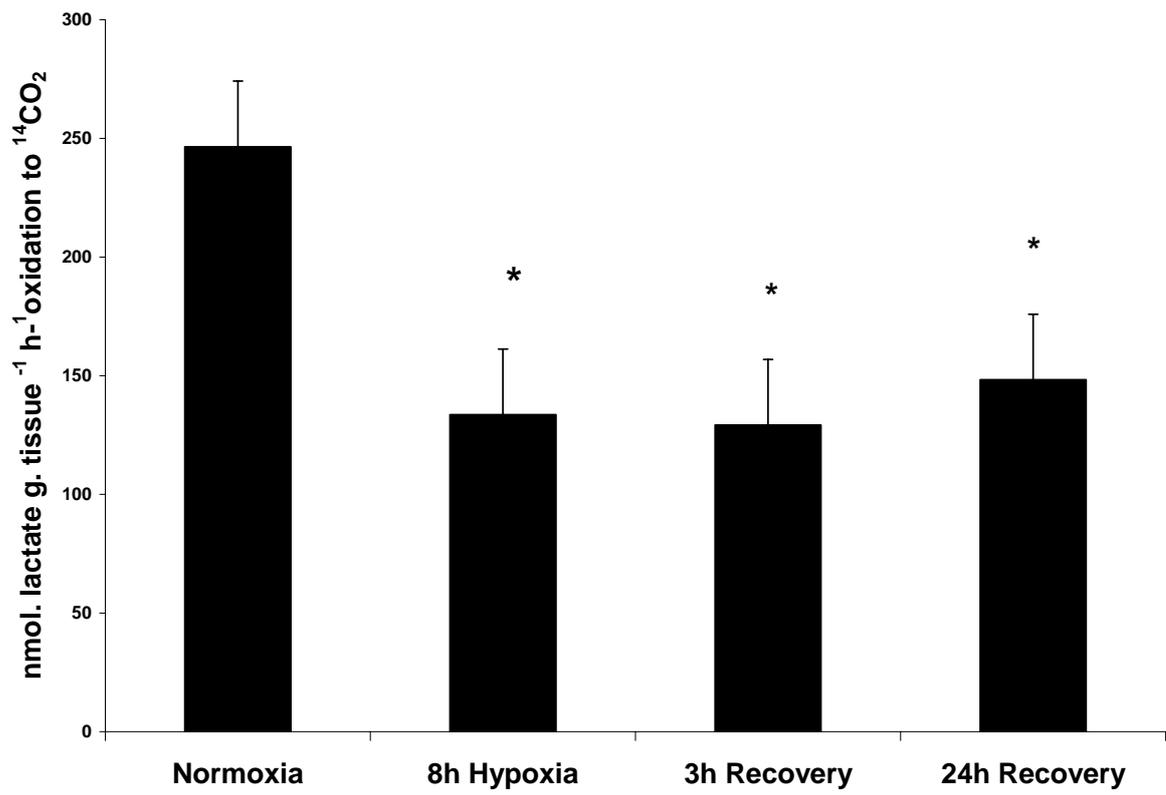
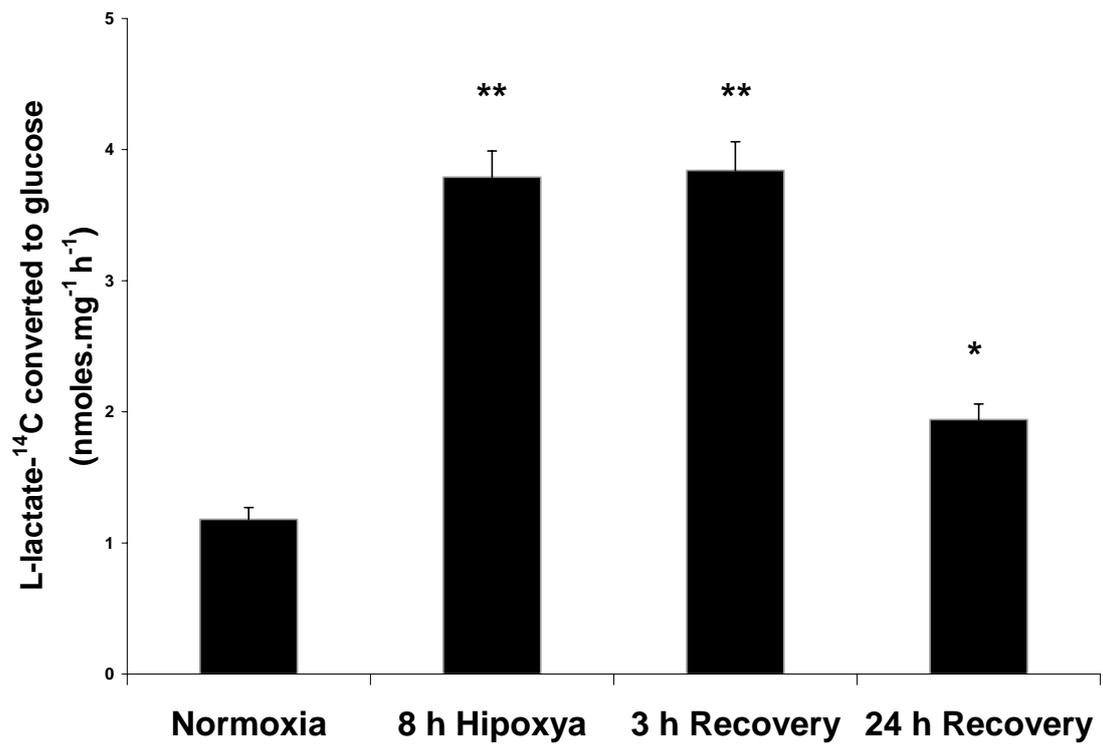


Fig.3



**Table 1** Effects of hypoxia and post-hypoxia recovery on hemolymph glucose and lactate levels in *C. granulatus*.

	<b>Hemolymph Lactate (mmol/L)</b>	<b>Hemolymph Glucose (mmol/L)</b>
Normoxia	0.54 ± 0.35	0.11 ± 0.01
Hypoxia		
8 hours	6.60 ± 0.30 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.07 <sup>a</sup>
Recovery		
3 hours	5.50 ± 0.30 <sup>a</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>a</sup>
24 hours	0.60 ± 0.10	0.12 ± 0.01

Values represent mean ± SEM

<sup>a</sup>Mean values are significantly different from the normoxia group ( $P < 0.05$ )

N = 4 crabs in each case

**Table 2** Effects of hypoxia and post-hypoxia recovery on *C. granulatus* lactate excretion to water.

<b>Water</b>	
<b>Lactato (mmol/L)</b>	
Normoxia	0.012 ± 0.001
Hypoxia 8 hours	0.062 ± 0.004 <sup>a</sup>
Recovery 3 hours	0.057 ± 0.004 <sup>a</sup>
24 hours	0.013 ± 0.001

Values represent mean ± SEM

<sup>a</sup>Mean values are significantly different from the normoxia group ( $P < 0.05$ )

N = 4 crabs in each case