

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

EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE O METABOLISMO DE
AMINOÁCIDOS NO MÚSCULO E NO HEPATOPÂNCREAS DO CARANGUEJO
Neohelice granulata SUBMETIDO PREVIAMENTE À DIETA RICA EM
PROTEÍNAS OU CARBOIDRATOS

Tese de Doutorado

RICARDO PELLEGRINO

Porto Alegre, 2011



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



Mestrado e Doutorado

Page: www.ufrgs.br/ppgfisio e-mail: ppgfisio@ufrgs.br

Rua Sarmiento Leite, 500 - 2º andar

90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: (51) 3308-3453

Fax: (51) 3308-3656

**EFEITO DO JEJUM E DA REALIMENTAÇÃO SOBRE O METABOLISMO DE
AMINOÁCIDOS NO MÚSCULO E NO HEPATOPÂNCREAS DO CARANGUEJO**

Neohelice granulata SUBMETIDO PREVIAMENTE À DIETA RICA EM
PROTEÍNAS OU CARBOIDRATOS

RICARDO PELLEGRINO

Orientadora: Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

Coorientador: Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

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, dezembro de 2011

CIP - Catalogação na Publicação

Pellegrino, Ricardo

Efeito do jejum e da realimentação sobre o metabolismo de aminoácidos no músculo e no hepatopâncreas do caranguejo *Neohelice granulata* submetido previamente a dieta rica em proteínas ou carboidratos / Ricardo Pellegrino. -- 2011.
122 f.

Orientadora: Roselis S.M. Da Silva.

Coorientador: Luiz C.R. Kucharski.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. Jejum. 2. Realimentação. 3. Caranguejo. 4. Aminoácidos. I. Da Silva, Roselis S.M., orient. II. Kucharski, Luiz C.R., coorient. III. Título.

Comissão Examinadora:

Wania Aparecida Partata
Prof^a Doutora do Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Fisiologia - UFRGS

Guendalina Turcato Oliveira
Prof^a Doutora do Departamento de Ciências
Fisiológicas - Faculdade de Biociências -
PUC/RS

José María Monserrat
Prof^o Doutor do Departamento de Ciências
Fisiológicas, Setor de Bioquímica - FURG

Dedico esse trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr^a Roselis Silveira Martins da Silva, pela orientação e instruções nos experimentos e principalmente pelos ensinamentos transmitidos com muito carinho, zelo e eficácia, que contribuíram imensamente em minha formação pessoal e profissional.

Ao meu coorientador Professor Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski, pelos incentivos, dedicação e pela notável atenção e disposição que contribuíram para os detalhes de um eficiente planejamento e execução dos experimentos realizados nesse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - Brasil e a Pró-Reitoria de Pós-graduação, por proporcionarem o apoio necessário ao meu aperfeiçoamento.

Aos amigos do laboratório, cúmplices desses 8 anos de importantes conquistas (Mestrado e Doutorado). O companheirismo, o carinho e a amizade de vocês me proporcionaram um ambiente de trabalho singular. Sou muito grato pelos auxílios prestados nos experimentos, incluindo a essencial parceria na coleta dos animais, e pela transmissão do rico conhecimento na execução das técnicas fundamentais para o bom andamento do trabalho.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação, pelo agradável convívio ao longo dessa jornada. A dedicação dispensada para o avanço da ciência é muito inspiradora e contagiante. Foi um imenso privilégio tê-los como exemplo profissional.

Ao amigo Tiago L. Martins pelo fundamental auxílio na execução dos experimentos, nas revisões dos protocolos e pela parceria e amizade tanto nos congressos como nos valiosos períodos de descontração.

À Prof^a Dr^a Ilma Simoni Brum da Silva pela concessão dos espaços físicos do Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia para o desenvolvimento dos procedimentos de extração e quantificação do RNA dos tecidos. Ao amigo Dr. Vanderlei Biolchi pelas imprescindíveis colaborações e assistência para a execução dessas técnicas.

À Prof^a Dr^a Vanessa Schein, pelas valiosas instruções na área da bioinformática e pela disponibilidade e concessão do Laboratório de Biologia Molecular para realização dos experimentos de expressão da PEPCK.

Aos colegas e amigos dos Laboratórios do Departamento de Fisiologia e de Bioquímica, pela amizade, atenção e companheirismo sempre presentes.

Aos funcionários da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, que através de suas dedicações profissionais compõem um ambiente harmônico de agradável convívio.

Aos familiares, aos amigos recentes e aos mais antigos, pela compreensão de algumas ausências em importantes datas e momentos do viver.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar, *in vitro*, os efeitos do jejum de 15 dias e da subsequente realimentação por 72, 96 e 120 horas, sobre o metabolismo de aminoácidos no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Neohelice granulata* previamente alimentado com uma dieta rica em carboidratos (HC) ou proteínas (HP). Para isso, foram realizados os seguintes procedimentos experimentais - captação de [U¹⁴C]-MeAIB (ácido metil-aminoisobutírico); síntese de ¹⁴C-proteínas a partir de [U¹⁴C]-leucina; síntese de ¹⁴C-lipídios, formação de ¹⁴CO₂ e síntese de ¹⁴C-glicose a partir de [U¹⁴C]-glicina; atividade da Na⁺-K⁺-ATPase e atividade e expressão do gene da enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Foram também determinadas as concentrações de proteínas no músculo mandibular e de glicogênio e de proteínas no hepatopâncreas. A composição da dieta, o jejum e a realimentação não modificaram a concentração de proteínas no tecido muscular. No hepatopâncreas, a concentração de proteínas foi maior nos animais do grupo controle HP. Os teores de glicogênio foram maiores no hepatopâncreas do grupo controle HC. A síntese de proteínas a partir de ¹⁴C-leucina e a oxidação da ¹⁴C-glicina foram maiores no músculo do grupo controle HC. No músculo e no hepatopâncreas, a síntese de glicose a partir de ¹⁴C-glicina foi maior nos animais controle HC. Nos animais mantidos com a dieta HP foi constatada uma alta atividade da PEPCK muscular e hepatopancreática. No músculo dos animais controle HC, os aminoácidos constituíram substratos para a síntese de lipídios, de proteínas e de glicose. No hepatopâncreas desses animais a ¹⁴C-glicina constituiu um importante substrato gliconeogênico. O padrão de ajuste no metabolismo de aminoácidos em resposta ao jejum utiliza diferentes vias segundo a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo. No músculo dos animais HP, os aminoácidos seriam utilizados como substratos energéticos durante o jejum e, no hepatopâncreas desses animais, o glicogênio e os aminoácidos seriam importantes substratos energéticos no período de jejum. Após a realimentação por 72 h, a glicina parece ser utilizada na síntese de lipídios no hepatopâncreas dos animais HC e, nesse mesmo período, a síntese de proteínas e de lipídios parecem ser as principais vias metabólicas para os aminoácidos no hepatopâncreas dos animais HP. Após 120 h de realimentação, a gliconeogênese e a síntese de proteínas constituíram as principais vias metabólicas para os aminoácidos no hepatopâncreas dos animais HC e, para o hepatopâncreas dos animais HP, a via gliconeogênica. Esses resultados demonstram importantes alterações no fluxo de carbono dos aminoácidos entre as diferentes vias metabólicas no músculo e no hepatopâncreas do caranguejo *N. granulata*. Tais mudanças constituem estratégias utilizadas durante o jejum e a realimentação conforme a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ¹⁴C** – Carbono 14 (isótopo radioativo)
- AIB** – *Aminoisobutyric acid*
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- C. granulatus*** – *Chasmagnathus granulatus*
- cDNA** - Ácido desoxirribonucléico complementar
- EDTA** - Etilenodiaminotetracético Dissódico
- FBFase** – Frutose-1,6-bifosfatase
- G6Fase** – Glicose-6-fosfatase
- GSH** - Glutathiona reduzida
- HC** – Carbohydrate-rich diet
- HDL** - *High-Density Lipoprotein*
- HEPES** – *N-[2-hidroxiethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]*
- HP** - High-Protein Diet
- ITP** - Trifosfato de Inosina
- LDL** – *Low-density lipoprotein*
- Me-AIB** - (ácido metil-aminoisobutírico)
- N. granulata*** – *Neohelice granulata*
- NADH** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
- PC** – Piruvato carboxilase
- PCR** - Reação em cadeia da polimerase
- PEPCK** - Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
- Pi** - Fosfato inorgânico ()
- PK** – Piruvato quinase
- PMSF** - Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- POPOP** - *2-p-phenylenebis 5-phenyloxazole*
- PPO** - *2,5-diphenyloxazole*
- RNA** - Ácido ribonucléico
- SFC** - Solução Fisiológica de Caranguejo
- TCA** – Ácido tricloracético
- TRIS** - tris(hidroximetil)aminometano
- VHDL** - *Very High-Density Lipoprotein*

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Composição das dietas oferecidas aos caranguejos

Tabela 2: Representação esquemática da composição dos tubos para os meios de incubação utilizados na determinação da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

Tabela 3. Efeito do jejum e da realimentação sobre a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e de proteína no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* submetido previamente à dieta HC ou HP

Figura 1. Exemplar de *Neohelice granulata*

Figura 2. Local de coleta do caranguejo *N. granulata*

Figura 3. Efeito do jejum e da realimentação sobre a captação de ^{14}C -MeAIB no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 4. Efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de ^{14}C -proteína a partir de ^{14}C -leucina no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 5. Efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de ^{14}C lipídios a partir de ^{14}C -glicina no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 6. Efeito do jejum e da realimentação sobre a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 7. Efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -glicina em ^{14}C -glicose no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 8. Efeito do jejum e da realimentação sobre a atividade da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 9. PCR do gene da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* analisado em gel de agarose

Figura 10. Efeito do jejum e da realimentação sobre a expressão da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

Figura 11. Efeito do jejum e da realimentação sobre a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS	
2.1. Geral.....	29
2.2. Específicos.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Produtos utilizados.....	30
3.2. Locais de execução dos experimentos.....	30
3.3. Coleta e manutenção dos animais.....	31
3.4. Procedimentos experimentais.....	32
3.5. Determinações bioquímicas.....	35
3.6. Análises estatísticas.....	47
4. RESULTADOS.....	48
5. DISCUSSÃO.....	71
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS.....	101

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo energético de crustáceos é caracterizado por variabilidades intra e inter-espécies, devido às peculiaridades biológicas e ecológicas desses animais, o que torna difícil a generalização (Oliveira et al., 2003). Tais variabilidades podem ser atribuídas a múltiplos fatores como variações sazonais, localização geográfica, habitat do animal, hábito alimentar entre outras (Kucharski; Da Silva, 1991b). Sendo também, influenciadas pelo ciclo da muda, maturidade sexual, processo reprodutivo, estado alimentar e nível de atividade motora (Schirf et al., 1987). O desenvolvimento de experimentos bem controlados e que consigam isolar e monitorar alguns desses fatores, como a temperatura, a salinidade e os componentes da dieta exibem um ponto de grande interesse para a investigação dos ajustes metabólicos frente ao desafio imposto pelo processo jejum-realimentação nesses animais.

O caranguejo *Neohelice granulata* é uma espécie tipicamente estuarina adaptada ao ambiente de pântanos salgados ou marismas e situa-se sistematicamente na Superclasse Crustacea, Classe Malacostraca, Ordem Decapoda, Superfamília Grapsoidea e Família Varunidae (Cuesta; Diesel; Schubart, 2001; Sakai; Türkay; Yang, 2006). Este caranguejo habita territórios neotropicais na zona mesolitoral e supralitoral a partir do estado do Rio de Janeiro até o Golfo de San Matías na Argentina (Turcato, 1990; Bond-Buckup et al., 1991; Spivak, 2010). A região estuária constitui um ecossistema resultante da transição entre o ambiente marinho e o límnic, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros de completa exposição do substrato (Odum, 1985).

Em seu habitat, o caranguejo *N. granulata* distribui-se por áreas com ou sem vegetação onde abre galerias ou tocas com dimensões variáveis, conforme os níveis da maré e do lençol freático. Esse procedimento garante a presença de água no fundo da toca e minimiza as amplitudes de variações de salinidade e de temperatura (Botto; Irigoyen, 1980). Em períodos de atividade, os animais maiores, principalmente os machos, são facilmente encontrados em locais abertos, enquanto as fêmeas e os animais jovens buscam refúgio junto à vegetação ribeirinha (Bond-Buckup et al., 1991) formada, em grande parte, por juncos.

Segundo Turcato (1990), nos meses de primavera e de verão, o caranguejo *N. granulata* é encontrado na zona infralitoral em busca de alimento. Já nos meses de outono e inverno, permanece no interior das tocas por um período maior e apresenta uma redução na atividade metabólica (D’Incao; Ruffino; Silva, 1988). No período de inverno, além da baixa temperatura ambiente, esse caranguejo depara-se com uma baixa oferta de itens alimentares e, conseqüentemente, menor disponibilidade de substrato energético (D’Incao et al., 1990). Durante os anos de 2005 e 2007 foram registradas, no local de coleta do caranguejo *N. granulata* (lagoa Tramandaí), as seguintes variações na temperatura ambiente: $18,5 \pm 6^{\circ}\text{C}$ e $32 \pm 2,8^{\circ}\text{C}$, no inverno e no verão, respectivamente (Valle et al., 2009).

Apesar do caranguejo *N. granulata* apresentar um sistema respiratório pouco favorável à respiração aérea (Santos et al., 1987), ele é capaz de suportar longos períodos fora da água e de exposição ao sol, sendo considerado tipicamente semiterrestre (Mañe-Gazon et al., 1974). Quando exposto ao ar atmosférico, diminui o consumo de oxigênio e reduz a mobilidade (Santos et al., 1987). Algumas espécies de caranguejos, assim como o *N. granulata*, conseguem manter as brânquias constantemente umedecidas

ao sair do ambiente aquático, através de um sistema de circulação localizado entre as bases dos pereiópodos que captam a água da superfície externa do corpo e a liberam na cavidade branquial, promovendo a renovação dos teores de oxigênio (Hartnoll, 1988; Bond-Buckup et al., 1991; Luquet et al., 2000).

Turcato (1990) encontrou uma importante variação do teor de oxigênio dissolvido (2,78 - 11,78mg O₂/L) e da salinidade (0,22‰ - 34‰) na água das tocas do caranguejo *N. granulata* na lagoa Tramandaí. Conforme Mañe-Garzon et al. (1974), essa espécie pode ser classificada como um animal regulador eurialino hiper-hiposmótico, pois suporta variações de salinidade de 0‰ até 40‰, ou seja, em um meio de alta concentração mantém a hemolinfa hiposmótica e, em um meio diluído, hiperosmótica. Um animal osmorregulador eurialino é capaz de tolerar as grandes variações de salinidade de seu habitat com mínimas alterações na osmolaridade hemolinfática (Huggins; Munday, 1968; Mantel; Farmer, 1983). Segundo Bromberg (1992), o *N. granulata* apresenta um ponto isosmótico situado entre 28,5‰ e 30‰ no inverno e no verão, respectivamente. Santos e Nery (1987) encontraram alterações nos níveis de glicose na hemolinfa do caranguejo *N. granulata*, submetido a diferentes salinidades e, concluíram que esta espécie aclimata-se melhor ao estresse hiperosmótico que ao hiposmótico.

Em relação ao comportamento alimentar, o *N. granulata* é classificado como onívoro-detritívoro e oportunista; na natureza ele se alimenta, predominantemente, de vegetais e de detritos (Bond-Buckup et al., 1991; D’Incao et al., 1990). Oportunamente alimenta-se de animais em avançado estado de decomposição e, eventualmente, comporta-se como canibalista, atacando sua própria comunidade (Botto; Irigoyen, 1980). A análise do conteúdo estomacal mostrou a presença de resíduos vegetais e animais com diferenças quantitativas e qualitativas de itens alimentares conforme a estação do ano (D’Incao et al.,

1990). Kucharski e Da Silva (1991a) verificaram que esse animal consome com facilidade diferentes dietas e, assim como em vertebrados, a composição da dieta influencia o padrão do metabolismo de carboidratos e de lipídios. No animal alimentado com uma dieta rica em carboidratos (HC)¹ os valores de glicose na hemolinfa e a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e no músculo estão elevados (Kucharski; Da Silva, 1991a).

A glicose é um importante substrato energético em caranguejos (Chang; O'Connors, 1983; Morris; Airries, 1998). Em crustáceos, a glicose tem diversos destinos principais: síntese de mucopolissacarídeos, síntese de quitina, síntese de ribose e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, síntese de glicogênio, formação de piruvato e síntese de lipídios (Hochachka et al, 1970; Herreid; Full, 1988; Marqueze et al., 2011).

Em crustáceos, o hepatopâncreas parece ser o principal local para o estoque de lipídios (O'Connor; Gilbert, 1968; Muriana et al., 1993; Garcia; Gonzalez-Baro; Pollero, 2002), embora o tecido muscular e as gônadas (fêmeas) também possam acumular lipídios (Komatsu; Ando, 1992). Em *N. granulata*, a concentração de lipídios totais no hepatopâncreas representa mais de 20% do peso do tecido (Kucharski; Da Silva, 1991b). O transporte de lipídios no plasma de crustáceos e em outros animais é realizado em associação com proteínas, formando lipoproteínas. A principal lipoproteína na hemolinfa de crustáceos parece ser HDL (*high-density lipoprotein*) embora LDL (*low-density lipoprotein*) e VHDL (*very high-density lipoprotein*) também estariam presentes (Kang; Spaziani, 1995; Garcia; Gonzalez-Baro; Pollero, 2002; Avarre et al., 2003).

O tecido muscular desempenha importantes funções metabólicas e contribui para a manutenção da homeostase quando o animal é exposto a diferentes desafios

¹ A Tabela 1 (Página 32 - Procedimentos experimentais) traz informações sobre as dietas oferecidas aos caranguejos.

ambientais via: síntese e mobilização de proteínas, fornecimento de substratos energéticos, metabolização do lactato hemolinfático entre outras funções (McNamara, 2004; Augusto et al., 2007; Maciel, et al., 2008; Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Os níveis de lactato e de glicose na hemolinfa de caranguejos *N. granulata* alimentados com dietas rica em carboidratos (HC) e rica em proteínas (HP) demonstraram uma razão lactato/glicose de 1,8 para os animais alimentados com a dieta HC e de 1,3 para os animais alimentados com a dieta HP, sugerindo que o lactato seja um importante substrato energético para esse caranguejo (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008).

O *N. granulata* é um caranguejo adaptado ao jejum, sendo capaz de manter a homeostase metabólica e durante a realimentação, apresenta um ajuste nos processos endergônicos de síntese para recuperar as reservas energéticas exauridas no período de jejum (Vinagre; Da Silva, 2002; Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Foi demonstrado que durante o jejum de 3 semanas ocorre diminuição da síntese de glicogênio a partir de ¹⁴C-glicina no músculo de *N. granulata*, contudo, após o período de realimentação por 48 horas, esses valores se assemelham àqueles do grupo alimentado (Vinagre; Da Silva, 2002). Algumas espécies de crustáceos, como o isópode hipógeno *Stenasellus virei*, sobrevivem a períodos de jejum superiores há duzentos dias (Hervant et al., 1997), demonstrando uma distinta e eficiente resposta metabólica para manter as reservas energéticas e, além disso, durante a realimentação, apresentam uma rápida recuperação das reservas exauridas (Hervant; Renault, 2002). Estratégias de hibernação, estoque e mobilização das reservas energéticas e diminuição da atividade metabólica, podem favorecer animais que enfrentam períodos de escassez de alimentos e podem evitar prejuízos ou morte (Castellini; Rea, 1992; Vinagre; Da Silva, 2002; Sánchez-Paz et al., 2007; McCue, 2010). Como encontrado em outros crustáceos, uma redução na atividade

metabólica contribui com a resistência ao período de jejum (Hervant; Mathieu; Barre, 1999; Mayrand; Guderley; Dutil, 2000; Mayrand; Dutil; Guderley, 2000; Hardy et al., 2000).

Os resultados do estudo realizado por Vinagre e Da Silva (1992), onde foi verificado o efeito do jejum de oito semanas sobre o metabolismo de carboidratos e de lipídios em *N. granulata*, demonstraram que, em animais previamente alimentados com uma dieta rica em proteínas (HP), os valores de glicose hemolinfática não apresentaram alterações significativas, permanecendo estáveis até o final do período experimental. Os valores de glicogênio hepatopancreático também não apresentaram alterações significativas ao longo desse período. Contudo, os níveis de glicogênio muscular diminuíram no início do jejum, permanecendo sem alterações significativas até o final do período. Nas brânquias, os níveis de glicogênio diminuíram progressivamente ao longo do jejum, chegando a valores nulos após dois meses. Os níveis de lipídios na hemolinfa aumentaram 100% nas duas primeiras semanas de jejum, mas ao final do período experimental retornaram a valores similares aos iniciais. Já os níveis de lipídios totais no hepatopâncreas diminuíram cerca de 50% após as oito semanas de jejum. Enquanto no músculo não foram constatadas variações significativas ao longo do período de jejum estudado. Nesse mesmo trabalho, foi estudado o efeito do jejum sobre o metabolismo de proteínas, mas, ao contrário do observado com relação ao metabolismo de carboidratos e lipídios, não foram constatadas alterações significativas nos parâmetros analisados (Vinagre, 1992).

Oliveira et al. (2004), estudando o efeito de diferentes tempos de jejum sobre a capacidade de conversão de ^{14}C -alanina ou ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose no hepatopâncreas, verificaram que os animais previamente alimentados com a dieta HP

apresentavam, no terceiro dia de jejum, uma redução na capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -alanina. Contudo, aos 15 dias de jejum, a gliconeogênese a partir de ^{14}C -alanina aumentou significativamente em relação aos valores iniciais, para novamente diminuir aos 21 dias de jejum. Já a conversão do ^{14}C -lactato em ^{14}C -glicose não apresentou alteração em relação aos valores iniciais.

Em caranguejos *N. granulata* alimentados previamente com a dieta HC os níveis de lactato hemolinfático foram quatro vezes maiores que aqueles constatados nos animais que receberam a dieta HP. Contudo, esse quadro inverte após o período de 15 dias de jejum, onde os níveis de lactato aumentam no grupo HP cerca de duas vezes e diminuem, significativamente, no grupo HC (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). De acordo com a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo, o padrão metabólico de ajuste ao jejum envolve diferentes vias. A capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -lactato reduz no tecido muscular dos animais previamente mantidos com a dieta HC. Porém, em animais previamente mantidos com a dieta HP um aumento na síntese de ^{14}C -glicogênio a partir de ^{14}C -lactato é constatado após 15 dias de jejum (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008).

Estes estudos em *N. granulata* demonstram a presença da via gliconeogênica no hepatopâncreas e no tecido muscular desse caranguejo, bem como a sua participação na homeostase durante diferentes períodos de jejum.

A realimentação após períodos de restrição alimentar pode ser definida como sendo um estado nutricional transitório, com características distintas tanto do jejum como do período absorptivo e pode ser considerada como um “estado de histeria metabólica”, onde os processos de síntese são reativados (Sugden; Holness; Palmer, 1989).

Em vertebrados, alguns autores mostraram que a síntese de glicogênio durante o processo de realimentação ocorre pela via indireta e envolve a gliconeogênese. Essa condição ficou conhecida como “paradoxo da glicose”, onde a glicose forma compostos de três carbonos antes de ser estocada como glicogênio, ao invés da via direta, onde a glicose é fosforilada e incorporada à molécula de glicogênio (Newgard et al., 1984; Sugden; Holness; Palmer, 1989; Shulman; Landau, 1992). Nas investigações de Calder e Geddes (1992) com ratos realimentados após 40 horas de jejum foi constatado um aumento marcante na síntese de glicogênio, tanto no músculo como no fígado, alcançando valores superiores em relação aos animais alimentados. Nesses animais, no período de realimentação, há uma maior atividade dos processos endergônicos de síntese caracterizados por uma “superestimulação” na síntese de glicogênio. Tal ocorrência já havia sido notificada no fígado e no músculo de tartaruga e de peixe quando realimentados após 30 dias de jejum (Machado et al., 1988; Da Silva; Migliorini, 1990).

Estudos com outras espécies de crustáceos demonstram diversidade na estratégia metabólica utilizada durante a realimentação. Em *Gammarus fossarum*, o período de sete dias de realimentação promoveu uma recuperação parcial das reservas energéticas exauridas durante o jejum. Nos anfípodas *Niphargus virei* e *Niphargus rhenorhodanensis* uma plena recuperação das reservas foi estabelecida após quinze dias de realimentação (Hervant; Mathieu; Barre, 1999).

Vinagre e Da Silva (2002) em experimentos, *in vivo* e *in vitro*, em *N. granulata*, demonstraram que a realimentação por 48 horas, após 21 dias de jejum, aumentou significativamente no tecido muscular a capacidade de sintetizar ^{14}C -glicogênio (*in vivo*) e ^{14}C -glicose (*in vitro*) a partir de ^{14}C -glicina. Nesse mesmo tempo de realimentação, a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -glicina sofreu uma significativa

redução no tecido muscular (Vinagre; Da Silva, 2002). Em *N. granulata*, Pellegrino; Kucharski; Da Silva (2008) demonstraram que nos animais mantidos com a dieta HC a síntese de glicose e de glicogênio no tecido muscular estão envolvidas na manutenção dos níveis de lactato no estado alimentado. Entretanto, em caranguejos alimentados previamente com a dieta HP essas vias seriam responsáveis pela redução dos valores de lactato circulante durante os períodos de realimentação. (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008).

A gliconeogênese é o processo da produção e exportação de glicose a partir de precursores como os aminoácidos, o lactato e o glicerol. Esta via é filogeneticamente muito antiga sendo encontrada desde fungos até mamíferos (Moon, 1988) e conecta o metabolismo de carboidratos, de lipídios e de aminoácidos (Newsholme; Leech, 1983). Em mamíferos a gliconeogênese ocorre no fígado, nos rins e no intestino delgado (Newsholme; Leech, 1983; Mithieux et al., 2004; Habold et al., 2005). As atividades das quatro enzimas-chave da gliconeogênese - piruvato carboxilase (PC, E.C. 6.4.1.1), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK, E.C. 4.1.1.32), frutose-1-6-bifosfatase (FBFase, E.C. 3.1.3.11) e glicose-6-fosfatase (G6Fase, E.C. 3.1.3.9) - têm sido investigadas em uma variedade de espécies de invertebrados e vertebrados não mamíferos (Surholt; Newsholme, 1981; Moon, 1988). A localização das enzimas gliconeogênicas, principalmente a PEPCK, apresenta uma variação entre as espécies (Kraus-Friedmann, 1984; Moon, 1988; Corssmitt et al., 2001). A PC localiza-se na mitocôndria, a PEPCK localiza-se tanto no citosol como na mitocôndria e as demais enzimas gliconeogênicas encontram-se no citosol (Newsholme; Leech, 1983). Em humanos, a PEPCK localiza-se tanto no citosol como na mitocôndria (Corssmitt et al., 2001). Em aves, a PEPCK hepática tem maior atividade mitocondrial (Moon, 1988). Um estudo realizado com rim de frango verificou que a acidose e o jejum

não alteram a expressão da fração mitocondrial, mas aumentam a atividade da PEPCK citosólica (Watford et al., 1981). Em codornas submetidas ao jejum prolongado, foi verificada, *in vivo*, uma correlação positiva entre o aumento da atividade da PEPCK renal e hepática com a gliconeogênese (Sartori et al., 2000). Em trutas a PEPCK foi parcialmente clonada e sequenciada, sendo semelhante à enzima mitocondrial de mamíferos (Panserat, et al., 2001).

Devido à localização da PC, a mitocôndria torna-se um local obrigatório para a conversão de piruvato em fosfoenolpiruvato, onde existem duas vias para que o oxaloacetato seja convertido em fosfoenolpiruvato. A via mais simples envolve a PEPCK mitocondrial, onde o fosfoenolpiruvato produzido atravessa a membrana mitocondrial interna. A segunda via envolve a conversão de oxaloacetato, que não atravessa a membrana mitocondrial interna, em aspartato que é transportado para o citosol através do antiporte glutamato-aspartato. No citosol, o aspartato é novamente convertido em oxaloacetato (Devlin, 1998).

Uma via alternativa para que o oxaloacetato deixe o espaço mitocondrial seria a sua redução a malato que atravessa a membrana mitocondrial. No citosol, o malato pode ser oxidado novamente em oxaloacetato com formação de NADH que será utilizado posteriormente na redução do 1,3-difosfoglicerato (Newsholme; Leech, 1983).

Nos invertebrados, a participação da via gliconeogênica na manutenção da glicose hemolinfática difere entre as espécies (Moon, 1988). Zammit; Newsholme (1978) estudaram a atividade da PEPCK no músculo do caranguejo ferradura *Limulus polyphenus* e da lagosta *Homarus vulgaris* e sugeriram que essa enzima participa da oxidação de alguns aminoácidos através da conversão de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato. A

atividade da PEPCK e da FBFase foi demonstrada em tecidos do siri *Callinectes sapidus* (Lallier; Wash, 1991) de caranguejos *Chaceon fennei* e *Chaceon quinquendes* (Walsh; Henry, 1990) e em crustáceos hipógenos e epígenos (Hervant, 1996).

Em crustáceos, principalmente decápodes, o hepatopâncreas parece ser o principal local onde ocorre a gliconeogênese (Van Aardt, 1988; Hill; Taylor; Strang, 1991; Lallier; Wash, 1992; Oliveira; Da Silva, 1997; Hervant; Mathieu; Barre, 1999), embora alguns estudos apontem a presença dessa via em brânquias (Thabrew; Poat; Munday, 1971; Chittó, 2000; 2005), hemócitos (Johnston; Davies, 1973) e músculo (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008; Maciel et al., 2008).

Em caranguejos *N. granulata* a via gliconeogênica está envolvida em vários processos de ajuste metabólico durante o jejum, a realimentação, o estresse osmótico, a anoxia e a fase de recuperação da anoxia. Nesse caranguejo essa via foi constatada no músculo, nas brânquias e no hepatopâncreas (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008; Schein et al., 2004; Chittó, 2005; 2000; Oliveira; Da Silva, 1997). No hepatopâncreas de *N. granulata*, a presença dessa via e a atividade da PEPCK foram evidenciadas pela primeira vez por Oliveira e Da Silva, (1997). Schein et al. (2004) demonstraram a capacidade de conversão de ^{14}C -alanina em ^{14}C -glicose e a atividade da PEPCK no músculo mandibular de *N. granulata*. Os autores também constataram a presença de mRNA da PEPCK em hepatopâncreas, coração, brânquias e sistema nervoso desse caranguejo, como também, caracterizaram a seqüência do cDNA dessa enzima (AY074922) no músculo mandibular. Nesse tecido, a concentração da PEPCK está na ordem de 10^{-9} molar (Schein et al., 2004). Em músculo de ratos a concentração da PEPCK é muito baixa e encontra-se na ordem de 10^{-12} molar (Xavier et al., 2002). No estudo de Chittó et al. (2009) foi verificado que o músculo mandibular de *N. granulata* apresenta atividade da enzima G6Fase, demonstrando

que a via gliconeogênica nesse tecido seria completa, pela possibilidade de liberar glicose na hemolinfa.

Em *N. granulata* a gliconeogênese e a atividade da PEPCK muscular apresentam variação sazonal: durante o inverno as atividades da via e da PEPCK mitocondrial estão bastante reduzidas, sendo a atividade da enzima igualmente dividida entre as frações citosólicas e a mitocondrial. Por outro lado, no verão 85% da atividade da PEPCK encontra-se na fração mitocondrial (Schein et al., 2005a). Nesses animais no estado alimentado, inversamente ao que ocorre em vertebrados (Migliorini et al., 1973; Moon, 1988), a capacidade intrínseca do hepatopâncreas em sintetizar glicose é alta, independente do tipo da dieta oferecida e, cerca de 80% da atividade da enzima PEPCK ocorre na fração mitocondrial (Oliveira; Da Silva, 1997). Uma alta atividade gliconeogênica permite ao *N. granulata* responder às variações extremas de fatores ambientais, tais como a salinidade, a temperatura, o ciclo das marés e a escassez de alimentos, através da produção de glicose.

O estudo do efeito da variação sazonal sobre o metabolismo energético do caranguejo *N. granulata* demonstrou que o glicogênio do hepatopâncreas e do músculo constituem fonte de substrato energético durante a primavera e o verão. Já os lipídios musculares seriam utilizados como substrato energético no outono e no inverno, enquanto os lipídios do hepatopâncreas seriam mobilizados durante o período reprodutivo (Kucharski; Da Silva, 1991b). Recentemente, em pesquisa de campo com *N. granulata*, foi demonstrado que a concentração de glicose na hemolinfa é mais elevada durante o período de verão quando comparada às outras estações do ano (Valle et al., 2009). Ainda, durante o período de verão, esse caranguejo apresenta maior captação de ^{14}C -AIB nas brânquias anteriores e posteriores, quando comparada àquela verificada nos animais de inverno.

Sugerindo que a captação de aminoácidos, nesses tecidos, sofre alterações sazonais (Valle et al., 2009). O crustáceo *Ocypode quadrata* reduziu as reservas de glicogênio tecidual e de lipídios na hemolinfa, no verão e na primavera, respectivamente. No outono, os animais machos apresentaram aumento nos níveis de glicose na hemolinfa. Esse crustáceo apresenta maior atividade locomotora durante o verão e, no período de reprodução, os lipídios podem representar uma importante reserva energética (Vinagre et al., 2007). Em *N. granulata*, nos períodos de alto consumo energético, como a muda e a gametogênese, há uma expressiva mobilização de lipídios, especialmente os lipídios do hepatopâncreas (Kucharski; Da Silva, 1991a).

A variação sazonal da concentração de carboidratos em diferentes tecidos do *N. granulata* parece interferir na sua capacidade osmorreguladora. No verão, após o choque hiposmótico ou hiperosmótico, os níveis de carboidratos aumentaram em quase todos os tecidos estudados por Nery e Santos (1993), sugerindo a ativação da via gliconeogênica. Contudo, no inverno, em ambos os tipos de estresse osmótico, ocorreu mobilização de carboidratos somente nas brânquias (Nery; Santos, 1993). Em outro estudo, durante o processo de aclimação ao estresse hiperosmótico, observado entre os animais de inverno e de verão, foi verificada diferença no padrão de resposta gliconeogênica nas brânquias (Chittó et al., 2009).

Schein et al. (2005a) verificaram que no verão a atividade gliconeogênica no músculo mandibular do *N. granulata* diminuiu após 24 horas de estresse hiperosmótico e a atividade da PEPCCK diminuiu na fração mitocondrial e aumentou na fração citosólica. No entanto, após 72 horas de choque hiperosmótico, foi constatado aumento na atividade gliconeogênica, possivelmente, devido a um aumento na expressão gênica da PEPCCK ocorrido às 24 horas de estresse osmótico. No inverno, durante o choque hiposmótico, a

capacidade gliconeogênica e a atividade da PEPCK foram reduzidas e a expressão gênica da enzima achava-se extremamente baixa. Esses dados demonstraram que a via gliconeogênica muscular está envolvida nos ajustes metabólicos de aclimatação aos meios hiposmótico ou hiperosmótico e pode ser modulada conforme a estação do ano (Schein et al., 2005a).

Durante o estresse hiposmótico, em *N. granulata* alimentados com as dietas HC ou HP, os valores de glicose circulante aumentaram. Os animais que receberam uma dieta HC apresentaram uma diminuição significativa nos níveis de glicogênio hepatopancreático e muscular. Entretanto, no grupo que recebeu a dieta HP, o conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas aumentou e o muscular permaneceu inalterado após 72 horas de estresse hiposmótico, reforçando o possível envolvimento da via gliconeogênica (Da Silva; Kucharski, 1992).

Oliveira e Da Silva (2000) demonstraram o envolvimento da via gliconeogênica hepatopancreática na adaptação ao estresse hiposmótico no caranguejo *N. granulata*. Animais alimentados com dieta HP e submetidos ao estresse hiposmótico, durante um período de 144 horas, apresentaram um aumento na capacidade gliconeogênica a partir de ^{14}C -alanina após 72 horas de estresse. Nos animais submetidos a uma dieta HC o aumento na capacidade gliconeogênica somente foi verificado às 144 horas de estresse. Porém, quando o substrato utilizado era o ^{14}C -lactato, ambos os grupos apresentaram uma redução na capacidade gliconeogênica a partir de 72 horas de estresse hiposmótico. Esses dados sugerem que a gliconeogênese hepatopancreática está envolvida no ajuste metabólico de aminoácidos durante o estresse hiposmótico.

Segundo Gilles (1982, 1997), as mudanças na concentração de aminoácidos livres tissulares durante o ajuste osmótico ocorrem por meio de três mecanismos básicos: (1) deslocamento do equilíbrio entre influxo e efluxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; (2) alterações na capacidade de síntese e de oxidação desses aminoácidos; (3) modificações na capacidade de síntese e de degradação de proteínas.

Schein et al. (2005b) verificaram, no hepatopâncreas e no músculo de *N. granulata*, que o aumento na captação e redução na oxidação de aminoácidos seriam mecanismos envolvidos no aumento da concentração dos aminoácidos intracelulares em resposta ao estresse hiperosmótico. Por outro lado, em caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico, a oxidação de aminoácidos não seria um mecanismo envolvido na redução da concentração de aminoácidos nos tecidos hepatopancreático e muscular. Outros estudos também demonstram que o tecido muscular de *N. granulata* participa do processo de aclimação às distintas salinidades, ativando ou inibindo as vias metabólicas que regulam a concentração dos aminoácidos intracelulares (Schein et al., 2004, 2005a; Martins et al., 2011).

Schein (1999) determinou as concentrações hemolinfáticas de diferentes aminoácidos em caranguejos *N. granulata* alimentados com dietas HC ou HP e não constatou diferença significativa entre os dois grupos experimentais. Os principais aminoácidos circulantes encontrados foram a glicina, a serina, a arginina, a alanina e a prolina, sendo a glicina o aminoácido em maior concentração na hemolinfa dos animais do grupo HP.

Em vertebrados, quatro principais sistemas de transporte de aminoácidos foram identificados com base na especificidade ao substrato e na dependência aos íons: A,

ASC, N e L. Os sistemas A e ASC são dependentes de sódio. O sistema A transporta aminoácidos neutros como alanina, serina, glicina, metionina, glutamina e prolina, bem como o análogo Me-AIB (ácido metil-aminoisobutírico). O sistema ASC transporta alanina, serina e cisteína. O sistema N transporta glicina, histidina e asparagina e o sistema L transporta aminoácidos neutros como leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, cicloleucina e também o análogo AIB (ácido aminoisobutírico) (Christensen et al., 1965; Lang et al., 1998; Yao et al., 2000).

O ácido metil-amino isobutírico (Me-AIB) pode acumular-se no espaço intracelular de forma semelhante aos aminoácidos naturais e, em preparações biológicas, é amplamente utilizado em investigações sobre o transporte de aminoácidos pelo sistema A (Debons; Pittman, 1962).

O caranguejo *N. granulata*, em função da excelente aclimação às condições laboratoriais e da grande capacidade para enfrentar as variações de salinidade, de temperatura, de teor de oxigênio e de disponibilidade de alimento em seu habitat, é considerado um modelo biológico muito adequado para investigações sobre o controle do metabolismo intermediário em crustáceos.

Estudos prévios realizados em *N. granulata*, utilizando substratos marcados para analisar o efeito de diferentes tempos de jejum e de realimentação (Vinagre; Da Silva, 1992, 2002; Oliveira; Da Silva, 1997; Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008), sustentam a presença e a participação de importantes vias metabólicas nos tecidos hepatopancreático e muscular desse caranguejo. Contudo, até o momento, não foi investigado se a composição da dieta interfere no metabolismo de aminoácidos durante o processo de ajuste metabólico ao jejum e aos diferentes períodos de realimentação.

Conforme abordado na introdução deste trabalho, o *N. granulata* é um caranguejo adaptado ao jejum mantendo a homeostase metabólica. Contudo, o padrão metabólico de ajuste ao jejum utiliza diferentes vias segundo a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo. Assim, a hipótese deste trabalho seria de que a quantidade das proteínas da dieta influenciariam o metabolismo dos aminoácidos em resposta ao jejum e aos diferentes tempos de realimentação no músculo e no hepatopâncreas do caranguejo *N. granulata* submetido à dieta rica em carboidratos ou proteínas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito do jejum e da realimentação sobre o metabolismo de aminoácidos no hepatopâncreas e no músculo do caranguejo *Neohelice granulata* alimentado com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas.

2.2 Específicos

a) Analisar, *in vitro*, os efeitos do jejum de 15 dias e da subsequente realimentação por 72, 96 e 120 horas, em caranguejos *N. granulata* previamente submetido à dieta rica em carboidratos ou proteínas, sobre os seguintes parâmetros:

- captação de [U¹⁴C]-MeAIB e síntese de ¹⁴C-proteínas a partir de [U¹⁴C]-leucina no músculo mandibular e no hepatopâncreas;

- síntese de ¹⁴C-lipídios, formação de ¹⁴CO₂ e síntese de ¹⁴C-glicose a partir de [U¹⁴C]-glicina no músculo mandibular e no hepatopâncreas;

- atividade da Na⁺-K⁺-ATPase e atividade e expressão do gene da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas.

b) Investigar o efeito do jejum e da realimentação sobre as concentrações de proteínas no músculo mandibular e de glicogênio e de proteínas no hepatopâncreas de caranguejos *N. granulata* alimentados previamente com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produtos utilizados

Ácido acético p.a; ácido bórico (H_3BO_3) p.a; ácido clorídrico (HCl) p.a; ácido ortofosfórico; ácido sulfúrico concentrado p.a; ácido tricloroacético (TCA) p.a; adenosina trifosfato (ATP); agarose; albumina bovina; álcool; álcool etílico p.a; álcool polivinílico; anisaldeído; carbogênio ($O_2:CO_2$ - 95:5% - v/v); carbonato de sódio (Na_2CO_3); cloreto de cálcio ($CaCl_2$); cloreto de magnésio ($MgCl_2$); cloreto de potássio (KCl) p.a; cloreto de sódio (NaCl) p.a; clorofórmio; CO_2 ; *comassie brilliant blue*; etanol; éter; etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA); fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF); fosfato de potássio monobásico (K_2HPO_4); glicina; glicogênio; glicose; glutationa (GSH); hidróxido de bário ($Ba(OH_2)$) p.a; hidróxido de potássio (KOH) p.a; hidróxido de sódio (NaOH); inosina trifosfato (ITP); leucina; metanol; molibdato de amônio; *N*-[2-*hidroxiethyl*]piperazine-*N'*-[2-*ethanesulfonic acid*] (Hepes); $NaH^{14}CO_3$; $NaHCO_3$; *N*-butanol p.a; nitrogênio líquido, oxalacetato; sulfato de sódio (Na_2SO_4) p.a; sulfato de zinco ($ZnSO_4$) p.a; tolueno-triton X-100; Tris (hidroximetil) amino metano ($C_4H_{11}NO_3$) p.a; Tris-HCl; verde malaquita; $[U^{14}C]$ -MeAIB (ácido metil-aminoisobutírico); *1,4-bis*[2-(5-*phenyloxazolyl*)]*benzene* (POPOP); *2,5-diphenyloxazole* (PPO); $[U^{14}C]$ -glicina; $[U^{14}C]$ -leucina.

3.2. Locais de execução dos experimentos

Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada - LaMEC, localizado no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Para execução dos

experimentos de biologia molecular foram utilizados o Laboratório de Endocrinologia Molecular e Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia e o Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica, ambos da UFRGS.

3.3. Coleta e manutenção dos animais

Os caranguejos *Neohelice granulata* (Figura 1) utilizados neste estudo foram capturados no município de Imbé, Rio Grande do Sul (29°58' latitude sul e 50°08' longitude oeste), numa região tipicamente estuarina que recebe as águas do oceano e do sistema lagunar de Tramandaí, o nível das águas é influenciado pelos ventos e marés (Würdig, 1984; Bond-Buckup et al., 1991) (Figura 2). Os caranguejos foram coletados nos meses correspondentes ao período de verão dos anos de 2008 a 2011. As coletas foram realizadas manualmente nas tocas, na água ou no sedimento areno-lodoso próximo à vegetação e, para minimizar possíveis efeitos do ciclo reprodutivo e da muda, foram utilizados animais adultos, machos e em estágio C do ciclo de intermudas (Drach; Tchernigovtzeff, 1967).



Foto cedida por Tiago L. Martins

Figura 1. Exemplo de *Neohelice granulata* fotografado no local de coleta



Fonte: DigitalGlobe - Google

Figura 2. Local de coleta do caranguejo *N. granulata* - município de Imbé, RS

O transporte dos animais, do local da coleta até o laboratório (cerca de 90 minutos), foi realizado em caixas plásticas (40L) contendo água do próprio local e, para evitar a fuga dos animais, uma grade metálica foi utilizada para cobrir a superfície da caixa. Após a chegada ao laboratório os animais eram imediatamente transferidos para uma caixa plástica (40L) contendo água destilada com aeração controlada. A realização desse procedimento, por um período de 24 horas, caracteriza um choque hiposmótico para o animal e é utilizado para eliminar possíveis parasitas e esvaziar parte do conteúdo intestinal (Kucharski, 1997).

3.4. Procedimentos experimentais

Após a realização do procedimento anterior, os caranguejos eram transferidos para um tanque maior (500L), onde permaneciam por uma semana sob as condições padrões do laboratório: temperatura constante de 25°C, fotoperíodo natural (ciclo claro:escuro), salinidade da água de 20‰, aeração constante e eram alimentados, *ad*

libitum, com carne bovina crua fatiada em pequenos cubos duas vezes por semana. Diariamente, era realizada uma inspeção para retirada dos resíduos alimentares e manutenção das condições padrões do laboratório.

Após esse período de aclimação, os animais eram distribuídos em dois aquários menores (60L) para a administração das dietas. Um grupo recebeu dieta Rica em Proteínas (carne bovina crua), identificada como dieta HP (*High-protein diet*) e, ao outro era oferecida dieta Rica em Carboidratos (arroz polido cozido), identificado como dieta HC (Carbohydrate-rich diet). O teor calórico das duas dietas utilizadas é semelhante, conforme análise realizada pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICTA/UFRGS (Tabela 1). As dietas HC ou HP eram oferecidas por um período de 15 dias e, ao final desse período, esses caranguejos constituíam o *grupo de animais controle*.

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

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

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

Após o período de 15 dias de dieta, os animais eram divididos em mais dois grupos: o *grupo de animais em jejum* – constituído dos animais previamente alimentados e que eram submetidos a 15 dias de jejum e o *grupo de animais realimentados* constituídos pelos animais que retornavam à respectiva dieta oferecida anteriormente ao jejum. O jejum era realizado em aquários próprios para tal finalidade (sem resíduos alimentares), dentro de gaiolas individuais (10x10x10) (para evitar o canibalismo) e sob as mesmas condições padrões do laboratório. A realimentação foi realizada por um período de 72, 96 e 120 horas.

Os animais dos três grupos experimentais (controle - jejum - realimentação) eram crioanestesiados (com gelo em escamas, por dez minutos), sempre no período da manhã, para extração do músculo mandibular e do hepatopâncreas. Os tecidos removidos eram conservados em placas de Petry, dispostas sobre gelo, contendo Solução Fisiológica de Caranguejo (SFC)² com osmolaridade semelhante a hemolinfa dos animais e acrescida de 1% de PMSF (Fluoreto de Fenilmetilsulfonil). Consecutivamente, os tecidos eram encaminhados às determinações bioquímicas. Os tecidos que foram utilizados no desenvolvimento dos experimentos de expressão da enzima PEPCCK eram extraídos dos animais, congelados em nitrogênio líquido dentro de tubos previamente preparados com RNase-Away (Molecular Bio Products - Inc. México) e armazenados em freezer (-80°C) até a realização dos procedimentos experimentais.

² Solução Fisiológica de Caranguejo (SFC): 350mM NaCl, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 8,8mM H₃BO₃, 10mM Hepes, 25mM CaCl₂, pH 7,8.

3.5. Determinações bioquímicas

Dosagem de proteínas do músculo mandibular e do hepatopâncreas

O teor de proteínas do músculo mandibular e do hepatopâncreas foi dosado pelo método de Bradford (1976) e albumina bovina foi utilizada como padrão. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech), com comprimento de onda a 595nm e os resultados foram expressos em g de proteínas.100g⁻¹ de tecido (g%).

Determinação da concentração de glicogênio no hepatopâncreas

O isolamento do glicogênio foi realizado segundo o método de Van Handel (1965). Amostras do hepatopâncreas (100mg) removidas dos caranguejos foram depositadas em tubos cônicos de vidro, com capacidade para 10mL, contendo 2mL de KOH 30% e submetidas à digestão em banho fervente por 60 minutos. Para a precipitação do glicogênio, foram adicionados aos tubos, Na₂SO₄ saturado e álcool etílico (92%) e, posteriormente, foram centrifugados por 10 minutos a 2700g. O precipitado foi ressuspenso em água destilada aquecida e amostras de 300µL foram hidrolisadas com HCl 4N (300µL), aquecidas em banho-maria (100°C) por 45 minutos e neutralizadas com Na₂CO₃ 2M (300µL) conforme descrito por Geary; Langhans e Scharrer (1981).

O glicogênio foi dosado como glicose utilizando-se o método enzimático da glicose-oxidase com o Kit Glicose PAP liquiform (Labtest Diagnóstica SA) em amostras de 50µL. A leitura das amostras foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech) contra o branco do reagente em comprimento de onda a

505nm. Uma curva padrão de glicogênio (1mg/mL) foi utilizada como fator de calibração e os resultados foram expressos em g de glicogênio.100g⁻¹ de tecido (g%).

Captação de aminoácidos - (¹⁴C-MeAIB)

Amostras do tecido hepatopancreático (200 - 250mg) ou muscular (40 - 60mg) dos caranguejos foram depositadas em tubos com capacidade para 2mL contendo 500μL de SFC, PMSF (1%) e 0,2μCi de ácido metil-aminoisobutírico ([U¹⁴C]-MeAIB) (Du Pont 2,22GBq/mmol, 60mCi/mol). Os tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂ - 95:5% - v/v) por 30 segundos, tampados e submetidos a incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff, por 60 minutos, com agitação constante e temperatura de 25°C. Transcorrido esse período, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. As amostras foram lavadas por três vezes consecutivas com solução fisiológica de caranguejo, secas em papel filtro e colocadas em tubos (pirex), com tampa, contendo 1mL de água destilada. Os tubos foram congelados a -20°C e, posteriormente, fervidos durante 25 minutos. Este procedimento (congelamento - fervura) foi realizado por três vezes consecutivas para promover a liberação dos análogos captados, sendo este meio considerado o “meio interno” e, o meio de incubação o “meio externo”.

Amostras de 100μL do meio interno e do meio externo foram transferidas para tubos *vials* contendo 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi estimada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram obtidos pela relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno - T) e no meio de incubação (meio externo - M): dpm/mL do meio interno dividido pelo dpm/mL do meio de incubação (T/M).

Síntese de proteínas a partir de [U¹⁴C]-leucina

A síntese de proteínas foi determinada segundo Richardson et al. (1997). Amostras do tecido hepatopancreático (150 - 200mg) ou muscular (40 - 60mg) dos caranguejos foram depositadas em tubos com capacidade para 2mL contendo 500µL de solução fisiológica de caranguejo acrescidos de 0,2µCi de [U¹⁴C]-leucina (Amersham International: 11,7 GBq/mmol, 315mCi/mmol) e 5mM de leucina não marcada, pH 7,4. Os tubos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂ - 95:5% - v/v) por 30 segundos, tampados e submetidos a incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff durante 180 minutos, com agitação constante e temperatura de 25°C. Transcorrido esse período, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. As amostras foram lavadas com solução fisiológica de caranguejo, secas em papel filtro e transferidas para tubos contendo 500µL de água destilada onde foram homogeneizadas (Omni Mixer). Amostras de 50µL do homogeneizado eram reservadas para a determinação da concentração de proteínas.

Para a quantificação das ¹⁴C-proteínas sintetizadas, 100µL das amostras foram aplicados em tiras de papel Whatman 3MM e, após a secagem, as tiras de papel foram incubadas com TCA 10% por 10 minutos, para que ocorresse a precipitação das ¹⁴C-proteínas. A seguir, para eliminação dos lipídios, as tiras de papel foram lavadas sob agitação constante, duas vezes com álcool 92% por 10 minutos e duas vezes com éter por 5 minutos. Posteriormente, as tiras de papel foram secas e acondicionadas em frascos (*vial*) contendo 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi estimada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram concluídos como ¹⁴C-leucina convertida em ¹⁴C-proteína e expressos como µmol.mg⁻¹ de proteína.tempo⁻¹ de incubação.

Síntese de ^{14}C -lipídios a partir de $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glicina

Amostras do tecido hepatopancreático (100 - 150mg) ou muscular (40 - 50mg) dos caranguejos foram depositadas em tubos com capacidade para 2mL contendo 500 μL de solução fisiológica de caranguejo acrescidos de 0,2 μCi de $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glicina (Amersham International: 114mCi/mmol) e 5mM de glicina não marcada. Uma parte dos tecidos era reservada para a determinação da concentração de proteínas. Os tubos com as amostras e o meio de incubação foram aerados com carbogênio ($\text{O}_2:\text{CO}_2$ - 95:5% - v/v) por 30 segundos, tampados e submetidos a incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff, por 60 minutos, com agitação constante e temperatura de 25°C. Transcorrido esse período, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. As amostras dos tecidos foram lavadas por três vezes consecutivas em solução fisiológica de caranguejo e os ^{14}C -lipídios foram extraídos com uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) conforme o método descrito por Folch; Lees e Stanley (1957). Amostras da fase clorofórmica foram colocadas em tubos (*vial*) e, após a evaporação do clorofórmio, foram acrescidos 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi estimada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram concluídos como ^{14}C -glicina convertida em ^{14}C -lipídio e expressos como $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína/h $^{-1}$.

Formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de $[\text{U}^{14}\text{C}]$ -glicina

A determinação da produção de $^{14}\text{CO}_2$ foi realizada conforme método descrito por De Oliveira et al. (2002). Amostras do tecido hepatopancreático (250 - 300mg) ou muscular (40 - 60mg) dos caranguejos foram adicionadas em frascos de vidro contendo 500 μL do meio de incubação constituído de solução fisiológica de caranguejo,

PMSF (1%), 0,2 μ Ci de [U¹⁴C]-glicina (Amershan Biotech, 114mCi/mmoL) e 5mM de glicina não marcada. Para a captação do ¹⁴CO₂ resultante da oxidação do substrato oferecido, uma pequena tira de papel Whatman 3MM era acondicionada num poço que ficava preso à tampa de borracha do frasco. Os frascos foram aerados com carbogênio (O₂:CO₂, 95:5% v/v), lacrados com tampas de borracha, vedados com parafilme e submetidos a incubação em banho metabólico do tipo Dubnoff, por 60 minutos, com agitação constante e temperatura de 25°C, conforme experimentos prévios realizados por Schein (2003). A reação de oxidação foi interrompida pela aplicação de 0,25mL de TCA 50% no meio de incubação e, de 0,20mL de hidróxido de hiamina 1M no poço onde ficavam as tiras de papel 3MM, ambas as aplicações foram realizadas através da tampa de borracha, utilizando-se seringa com agulha. Os frascos permaneceram lacrados e imóveis por 12 horas para promover a total fixação do ¹⁴CO₂ nas tiras de papel. Após esse período, a tira de papel 3MM era transferida para um novo frasco (*vial*) contendo 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. A radioatividade foi estimada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram concluídos como formação de ¹⁴CO₂ a partir de ¹⁴C-glicina e expressos em $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de tecido.h⁻¹.

Determinação da gliconeogênese a partir de ¹⁴C-glicina

Para a determinação da gliconeogênese, amostras do músculo (40 - 60mg) ou do hepatopâncreas (100 - 150mg) dos caranguejos foram depositadas em tubos com capacidade para 2mL contendo 500 μ L de solução fisiológica de caranguejo, PMSF (1%), 0,2 μ Ci de [U¹⁴C]-glicina (Amershan International, 114mCi/mmoL) e 5mM de glicina não marcada. Os tubos com as amostras e o meio de incubação foram aerados com carbogênio

(O₂:CO₂ - 95:5 - v/v) por 30 segundos, tampados e submetidos à incubação, por 180 minutos, em banho metabólico do tipo Dubnoff, com agitação constante e temperatura de 25°C. Transcorrido esse período, as reações teciduais foram interrompidas pelo depósito parcial dos tubos em gelo. Os tecidos eram reservados para determinação da concentração de proteínas e os meios de incubação eram centrifugados a 4000g por 2 minutos. Amostras de 300µL do sobrenadante foram transferidas para tubos contendo 75µL de Ba(OH)₂ saturado e 75µL de ZnSO₄ a 2% para desproteínização (Sommogy, 1945). Após nova centrifugação a 6000g por 10 minutos, o sobrenadante foi utilizado para determinação da gliconeogênese.

A determinação da ¹⁴C-glicose foi realizada por meio de cromatografia de camada delgada em placas de alumínio com sílica gel 60G - MERK, conforme método descrito por Baker; Huebotter e Schotz (1965) e adaptado por Oliveira e Da Silva (1997). Como solução carreadora foi utilizado 200mL de uma mistura de solvente constituída de - N-butanol : álcool etílico 95% : ácido acético 5,4% - na proporção de 500 : 316 : 184 (v/v/v). A atmosfera da cuba era previamente saturada e o espaço disponível para o solvente correr na placa era limitado a uma extensão de 6 cm a partir do ponto de origem, onde foram aplicadas as amostras. Nesse ponto foram aplicados 10µL da amostra juntamente com 10µL de solução padrão de glicose não marcada na concentração de 1,5mg.mL⁻¹ e 20µL desta solução foram utilizados como controle. A glicose foi revelada nas placas de cromatografia com uma solução de - álcool etílico 95% : anisaldeído : ácido sulfúrico concentrado - na proporção de 18:1:1 (v/v/v). As bandas com aproximadamente 2 cm foram recortadas e acondicionadas em frascos (*vial*) contendo 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. As amostras permaneceram refrigeradas (± 4°C) por um período de 24 horas. Após esse período, a

radioatividade foi avaliada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM. Os resultados foram considerados como ^{14}C -glicina convertida em ^{14}C -glicose e expressos como $\mu\text{mol.mg}^{-1}$ de proteína. tempo^{-1} de incubação.

Determinação da atividade da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK)

A atividade da PEPCK (E.C.4.1.1.32) foi realizada conforme o método descrito por Migliorini et al. (1973) e adaptado por Oliveira e Da Silva (1997) baseado na reação de troca entre H^{14}CO_3 e o oxalacetato. Amostras do músculo (40 - 60mg) ou do hepatopâncreas (250 - 300mg) dos caranguejos foram homogeneizadas com sacarose 0,25M e PMSF na proporção de 1:3:0,05 (p/v/v) em homogeneizador (Omni Mixer) com pistilo de teflon. Em centrífuga Sorval (rotor nº 24) o homogeneizado foi centrifugado (600g, 4°C) por 10 minutos e o sobrenadante obtido foi reservado e mantido sob gelo. Uma alíquota de 50 μL desse sobrenadante era reservada para determinar a concentração de proteínas.

O meio de incubação (500 μL) foi preparado com tampão Tris-HCl 0,625M, Oxalacetato 0,3M, MnCl_2 0,04M, MgCl_2 0,4M, Glutathione (GSH) 0,012M, Trifosfato de Inosina (ITP) 0,02M, NaHCO_3 (1M) e 0,4 μCi de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (8,4mCi/mmol - PerkinElmer™ - life sciences). Os tubos com os meios foram pré-incubados (37°C) por 5 minutos. Após a adição das amostras (50 μL), os tubos foram incubados (37°C) por 4 minutos em banho metabólico (tipo Dubnoff) e as reações enzimáticas foram interrompidas com a adição de 500 μL de ácido tricloroacético (TCA) 5%. As amostras foram aeradas com CO_2 , por 5 minutos, para eliminação do excesso de H^{14}CO_3 . Após, as amostras foram centrifugadas (3000g) por 10 minutos e 300 μL do sobrenadante transferidos para frascos (*vial*) contendo 3mL de líquido de cintilação [tolueno-triton X-

100 (2:1); PPO (0,4%); POPOP (0,01%)]. Um branco foi elaborado com todos os componentes do meio, exceto o ITP. A radioatividade foi estimada com a utilização de um contador LKB-Wallac calibrado com uma curva de correção para DPM e os valores obtidos com as leituras das amostras foram subtraídos pelos valores obtidos com as leituras do branco. A reação $H^{14}CO_3^-$ -Oxalacetato determinou a atividade da PEPCK e os resultados foram expressos como $\mu\text{mol } H^{14}CO_3 \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.minuto⁻¹.

Extração e quantificação de RNA

O músculo (20 - 30mg) e o hepatopâncreas (80 - 100mg) extraídos dos caranguejos foram congelados em nitrogênio líquido dentro de tubos previamente preparados com RNase-Away (Molecular Bio Products - Inc. México) e mantidos em freezer (-80°C) até o momento da utilização dos tecidos para a extração do RNA. A extração de RNA total foi realizada com a utilização do RNAspin Mini Kit (GE Healthcare - Germany) conforme o protocolo do fabricante.

Para a quantificação do RNA, uma alíquota de 1 μ L da solução de RNA de cada amostra foi quantificada por espectrofotometria (NanoDrop ND-1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorbâncias de 260 e 280nm foi dentro do intervalo de 1,6 a 2,1. Considerando que uma unidade de absorbância a 260nm corresponde a 40 μ g de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula: [RNA] = Absorbância 260 x 40 μ g/mL x Diluição. Para a síntese de cDNA foi utilizada 0,5 μ g de RNA total.

Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram desnaturadas (65°C) por 5 minutos juntamente com 1µL de dNTPmix 10mM e 1µL de random hexamers. Em seguida, a cada amostra foi adicionado 2µL de 10X PCR Buffer, 4µL de MgCl₂ 25mM, 2µL de DTT 0,1M e 1µL de Rnase OUT. As amostras foram incubadas (42°C) por 2 minutos, após esse período foi adicionado 1µL da enzima transcriptase reversa Superscript-II e as amostras foram incubadas (42°C) por 50 minutos. Após nova desnaturação (70°C) por 15 minutos, as amostras foram acrescidas de 1µL da enzima Rnase H de E. coli e incubadas (37°C) por 20 minutos para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume final de 23µL de cada amostra, as quais foram armazenadas (-20°C) (F17 Stock Freezer®, Prosdócimo) até serem utilizadas para a amplificação dos genes alvos por PCR. As reações de transcrição reversa foram executadas utilizando o kit SuperScript® First-Strand®, Invitrogen em termociclador Veriti Thermal Cycle (Applied Biosystems, USA).

Expressão do gene da PEPCK

Os cDNAs sintetizados foram utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR da PEPCK foi efetuada com a utilização de *primers* específicos (5'-GCT TGT CAA CAA CTG GCC-3' e 5'-ATG ATC TCG TTG GAT TCG GG-3' - GenBank AY074922.1). O cDNA (4µL) foi utilizado como molde para PCR com um volume final de 25µL contendo 1,5mM MgCl₂, 2pmol de cada *primer* e 1U AmpliTaq DNA polymerase (Invitrogen). As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti Thermal Cycle (Applied Biosystems) com 35 ciclos de desnaturação (94°C) por um minuto, mais um minuto (56°C) e extensão (72°C) por um minuto. O tamanho do fragmento amplificado foi de 72bp. O gene de controle endógeno utilizado foi o 16S (5'-

ATT GAA TGG CCG CGG TAT CTT GAC-3' e 5'-AGC TTT CTA GGG TCT TAT CGT CCC-3'- GenBank AJ250640.1) e o tamanho da PCR foi de 130bp. Os fragmentos de cDNA amplificados pela PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3,5%). Após o tempo de corrida adequado, o gel foi analisado no aparelho Gelianace 600 Image System (Perkin Elmer) e as imagens capturadas. A normalização da expressão da PEPCCK foi feita com o gene 16S e as análises densitométricas foram realizadas através do programa AlphaEase[®]FC 6.0.0 (Alpha Innotech Corporation).

Determinação da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase

Para determinar a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3), o isolamento das membranas foi realizado conforme o método descrito por Barnes e Blackstock (1993). Todo material utilizado foi previamente lavado com NaOH 30% e as soluções utilizadas foram sempre mantidas em banho de gelo. Amostras do músculo (50mg) ou do hepatopâncreas (150mg) dos caranguejos foram homogeneizadas (Omni Mixer) em solução tampão (Tris-HCl 1,35 M, PMSF 1%, pH 7,4) na proporção 1:5 (p:v). O tecido homogeneizado foi centrifugado (10.000g, 4°C) por 10 minutos em centrífuga Sorval (5B-Rotor SM 24, Du Pont Instruments, EUA) e o sobrenadante foi centrifugado (40.000g, 4°C) por 25 minutos. O precipitado, desta segunda centrifugação, foi ressuspensão com 1mL do mesmo tampão (Tris-HCl) e novamente centrifugado (40.000g, 4°C) por 20 minutos. O precipitado obtido foi ressuspensão com 500µL do tampão (Tris-HCl) e, antes de ser congelado (-20°C) por 12 horas, uma amostra de 50µL era reservada para determinar a concentração de proteínas.

A atividade da Na⁺-K⁺-ATPase foi determinada conforme o método descrito por Esmann (1988) e todo o processo de incubação foi realizado em sala escura. Foram

elaborados dois meios de incubação, A e B, constituídos por NaCl (1M), MgCl₂ (60mM), KCl (100mM) e EDTA (1mM), pH 7,4, sendo que, a ouabaína foi adicionada somente no meio de incubação B. As amostras foram pré-incubadas (30°C), por 5 minutos, em tubos com os meios de incubação A e B, mas sem a adição do ATP (30mM). Após esse período, o ATP (20µL) foi adicionado nos meios de incubação A e B, com intervalos de 30 segundos entre as amostras e, após 30 minutos de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 200µL de TCA 10%. Os tubos com os meios de incubação originais A e B foram acompanhados por tubos A' e B' com as mesmas características dos meios originais, porém, sem a adição da amostra (Tabela 2).

Tabela 2: Representação esquemática da composição dos tubos para os meios de incubação A, B, A' e B' utilizados na determinação da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase

T U B O S				
	A'	A	B'	B
Meio				
Ouabaína				
Amostra				
ATP				

Quadro preenchido indica presença do produto

O fosfato inorgânico (Pi) liberado foi determinado conforme o método descrito por Chan e Swaminathan (1986). Foi utilizada a proporção 2:2:1:1 (v:v:v:v) para o preparo da solução reagente com Verde Malaquita : Água MilliQ : Molibdato de Amônio : Álcool Polivinílico, respectivamente. Após agitação dos produtos por 30 minutos, a ausência de contaminação por Pi foi confirmada pela coloração amarelo-ouro da solução e

o tempo de uso foi de, no máximo, 20 minutos após o preparo. A leitura das amostras (70 μ L) foi realizada em aparelho espectrofotômetro (Ultraspec 2000 – Pharmacia Biotech), em comprimento de onda a 630nm. Foi utilizada uma curva padrão com K₂HPO₄ (fosfato de potássio monobásico) para o cálculo da concentração de Pi das amostras e, a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase foi calculada pela diferença na concentração de Pi entre os meios de incubação A e B. Os valores de leitura dos meios A e B foram subtraídos dos valores de leitura dos respectivos meios A' e B' e os resultados foram expressos como μ mol de Pi.mg⁻¹ de proteína.min⁻¹.

3.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão da média (Média \pm DPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Dos dados obtidos, para a comparação entre os grupos de tratamento semelhante foi utilizada a análise de variância de uma via (ANOVA) ou de duas vias para comparação entre tratamentos distintos e acompanhados pelo teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As análises foram realizadas com o programa SigmaStat 3.1 (Jandel Corporation).

4. RESULTADOS

A composição da dieta não modificou a concentração de proteínas no tecido muscular e, após os períodos de jejum e de realimentação, não foram observadas alterações significativas nas concentrações de proteínas musculares nos animais submetidos à dieta HC e HP (Tabela 3).

No hepatopâncreas, o grupo controle submetido à dieta HP apresentou valores de concentração de proteínas 1,6 vezes maiores ($p < 0,01$) que os valores encontrados no grupo controle HC. Após o período de jejum, foram observadas alterações significativas na concentração de proteínas no hepatopâncreas dos animais de ambas as dietas, o grupo HP reduziu 51% e o grupo HC aumentou 51% as concentrações de proteínas quando comparadas aos respectivos grupos controle (Tabela 3).

Nos períodos de realimentação estudados, os valores da concentração de proteínas no hepatopâncreas dos animais submetidos à dieta HP retornaram a níveis semelhantes àqueles do grupo controle. Contudo, no grupo submetido à dieta HC os valores da concentração de proteínas no hepatopâncreas permaneceram elevados ao longo do período de realimentação (Tabela 3).

Nos animais alimentados com a dieta HC os valores de glicogênio hepatopancreático verificados no grupo controle foram 1,7 vezes maiores ($p < 0,05$) que os verificados no grupo controle HP. Após o período de jejum, essa diferença aumentou para 3,1 vezes ($p < 0,01$), pois as reservas de glicogênio no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HP diminuíram 47,4% ($p < 0,05$) nesse mesmo período. Nos períodos de realimentação, os valores de glicogênio no hepatopâncreas dos animais

submetidos à dieta HP retornaram a níveis semelhantes àqueles do grupo controle (Tabela 3).

O conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas dos animais submetidos à dieta HC não foi afetado pelo jejum, mas após 72 horas de realimentação constatou-se um aumento significativo de 45,3% e 50% em relação aos valores dos grupos controle e jejum, respectivamente, permanecendo elevado nos demais períodos de realimentação investigados, 96 e 120 horas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do jejum e da realimentação sobre a concentração de glicogênio no hepatopâncreas e de proteína no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* submetido previamente à dieta HC ou HP

	MÚSCULO		HEPATOPÂNCREAS			
	Proteína (g%)		Proteína (g%)		Glicogênio (g%)	
	HC	HP	HC	HP	HC	HP
Controle	4,90±0,30 (10)	4,46±0,93 (7)	2,23±0,59 * * (10)	3,69±0,51 (7)	0,95±0,22 * (5)	0,57±0,19 (5)
Jejum 15 dias	4,45±1,02 (5)	4,29±1,14 (5)	3,37±0,40 * a (5)	1,81±0,63 a (5)	0,92±0,22 * * (5)	0,30±0,15 a (5)
R 72h Realimentação	4,87±0,81 (5)	4,51±1,09 (5)	3,73±0,83 a (5)	3,76±1,25 b (5)	1,38±0,35 * * ab (5)	0,69±0,31 b (5)
R 96h Realimentação	4,96±0,33 (5)	5,21±0,19 (5)	3,55±0,47 a (5)	4,49±0,82 b (5)	1,50±0,20 * * ab (5)	0,81±0,15 b (5)
R 120h Realimentação	5,01±0,22 (5)	4,86±0,37 (5)	3,49±0,33 a (5)	3,72±0,95 b (5)	1,47±0,29 * * ab (5)	0,88±0,11 b (5)

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; (): número de animais; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); *: diferença entre dietas ($p < 0,05$); **: diferença entre dietas ($p < 0,01$).

No músculo dos caranguejos alimentados previamente com a dieta HC, os valores de captação de ^{14}C -MeAIB não sofreram variações significativas após 15 dias de jejum. Contudo, no período de realimentação os valores de captação de ^{14}C -MeAIB diminuíram significativamente (~58%) (Figura 3). Nos animais alimentados com a dieta HP, após o período de jejum e durante a realimentação por 72 h e 96, foi observada uma redução ($p>0,05$) nos valores de captação de ^{14}C -MeAIB no tecido muscular. No período de realimentação por 120 h foi constatado um aumento de 74% ($p<0,05$) em relação aos valores observados no grupo controle (Figura 3).

Nos animais alimentados com a dieta HC os níveis de captação de ^{14}C -MeAIB no hepatopâncreas foram maiores ($p>0,05$) que os níveis verificados no hepatopâncreas do grupo controle HP. O jejum não afetou a captação de ^{14}C -MeAIB no hepatopâncreas dos animais de ambas as dietas, mas após 72 horas de realimentação constatou-se uma redução significativa de 51% em relação aos valores dos grupo jejum verificados nos animais alimentados com a dieta HC. Nestes animais, na realimentação por 96 e 120 horas os níveis de captação de ^{14}C -MeAIB retornaram a valores semelhantes àqueles dos grupos controle e jejum (Figura 3). Os períodos de jejum e de realimentação estudados não afetaram significativamente a captação de ^{14}C -MeAIB no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HP. Contudo, no grupo de animais realimentados por 72 horas com a dieta HP, os níveis de captação de ^{14}C -MeAIB no hepatopâncreas foram 2,4 vezes maiores ($p<0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 3).

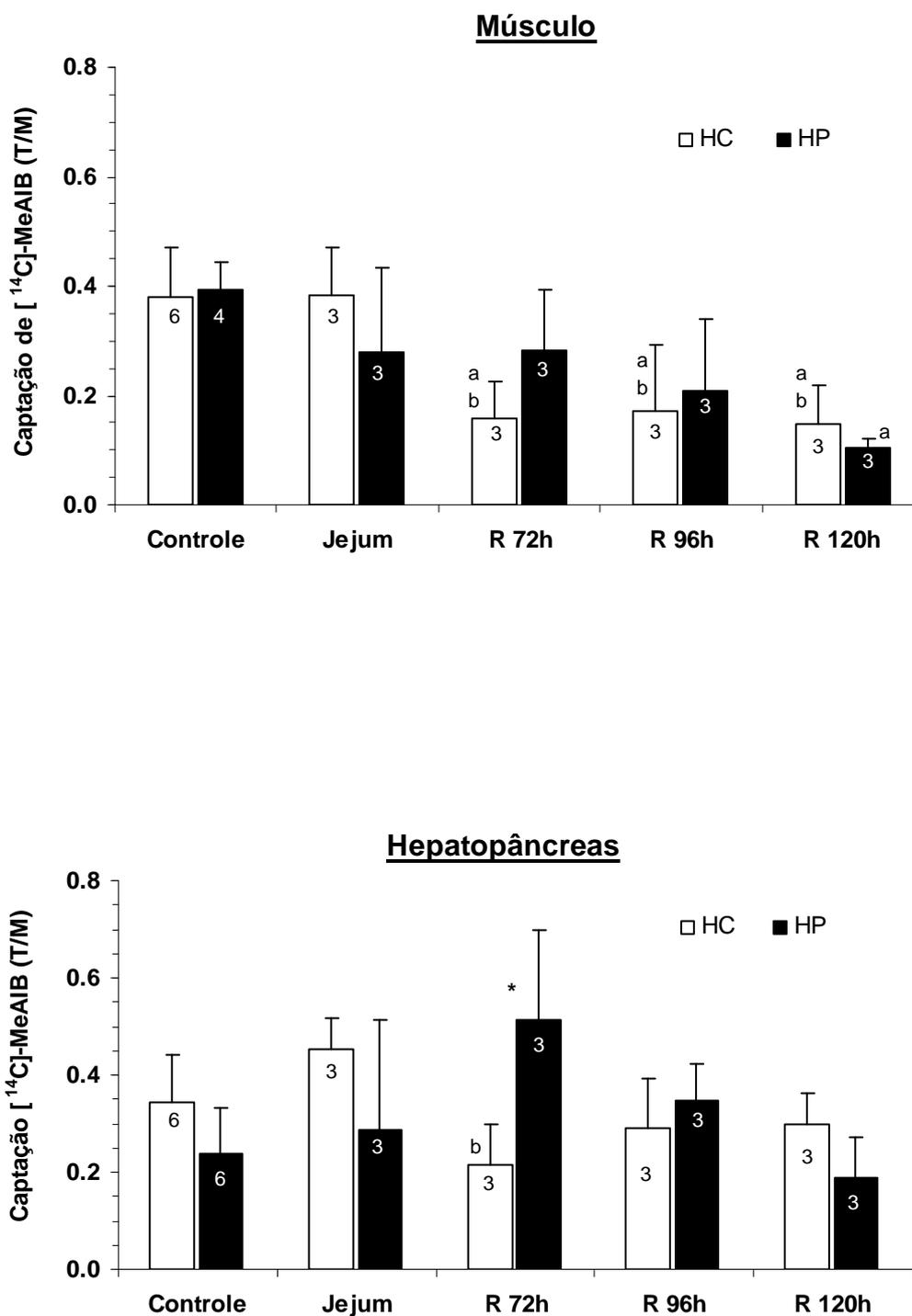


Figura 3. Efeito do jejum e da realimentação sobre a captação de ^{14}C -MeAIB no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$), *: diferença entre dietas ($p < 0,05$).

Nos animais submetidos à dieta HP, o jejum e a realimentação não alteraram significativamente a capacidade de síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina. A comparação entre a capacidade de síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina mostra que no músculo dos animais alimentados previamente com a dieta HC, a incorporação do ^{14}C da leucina em proteínas foi 2,3 vezes maior ($p < 0,05$) que àquela verificada no grupo que recebeu a dieta HP. Nos animais submetidos à dieta HC, o jejum (62%) e os períodos de 72 e 96 h de realimentação diminuíram significativamente ($p < 0,05$) a capacidade de sintetizar proteínas a partir de ^{14}C -leucina. Contudo, após 120 h de realimentação com a dieta HC os níveis de síntese de proteínas retornaram a valores semelhantes àqueles do grupo controle HC (Figura 4).

A composição da dieta (HC ou HP) e o jejum não modificaram significativamente a capacidade de sintetizar proteínas a partir de ^{14}C -leucina no hepatopâncreas. Contudo, nos períodos de realimentação estudados constataram-se aumentos significativos ($p < 0,05$) na síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HC ou HP (Figura 4).

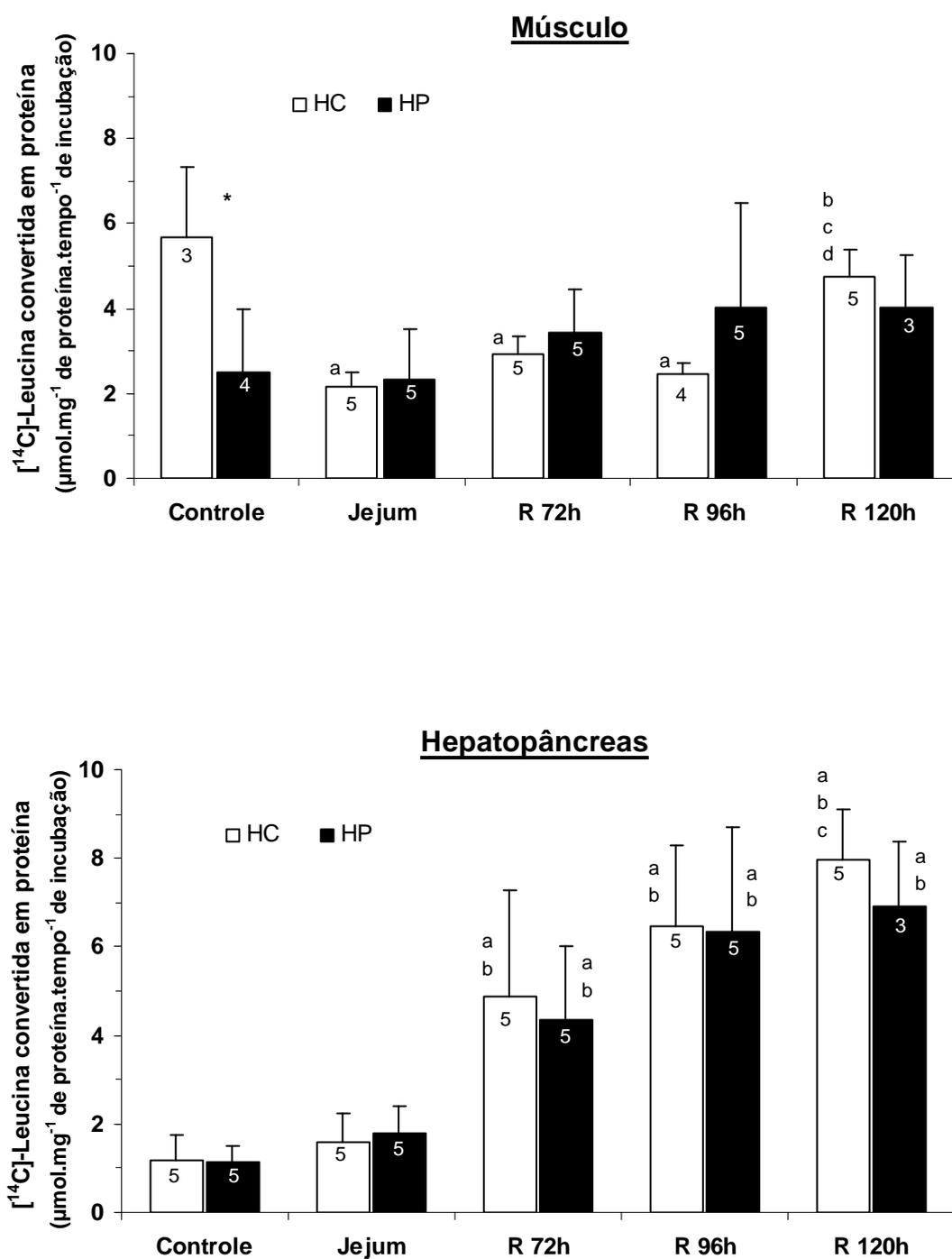


Figura 4. Efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de ¹⁴C-proteína a partir de ¹⁴C-leucina no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R 72h ($p < 0,05$); d: diferença em relação ao grupo R 96h ($p < 0,05$); * diferença entre dietas ($p < 0,05$).

No músculo do grupo controle, a composição da dieta não modificou a capacidade de sintetizar lipídios a partir de ^{14}C -glicina. Contudo, o jejum e a realimentação aumentaram marcadamente ($p < 0,05$) a capacidade de síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina no músculo dos animais alimentados com a dieta HC ou HP (Figura 5).

No hepatopâncreas, a composição da dieta (controles) e o jejum não modificaram a capacidade de sintetizar lipídios a partir de ^{14}C -glicina. Contudo, após a realimentação por 72 h a capacidade de síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina foi 6,2 vezes ($p < 0,05$) maior nos animais HC e 4,5 vezes ($p < 0,05$) maior nos animais HP, em relação aos valores verificados nos respectivos grupos controle. Após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HC a capacidade de síntese de lipídios retornou a valores semelhantes àqueles do grupo controle. Enquanto que nesses mesmos períodos de realimentação com a dieta HP a síntese de lipídios permaneceu significativamente ($p < 0,05$) elevada em relação aos valores do grupo controle (Figura 5).

No grupo de animais realimentados por 96 h com a dieta HP, a capacidade de síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina no hepatopâncreas foi 2,9 vezes maior ($p < 0,05$) que a capacidade verificada no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 5).

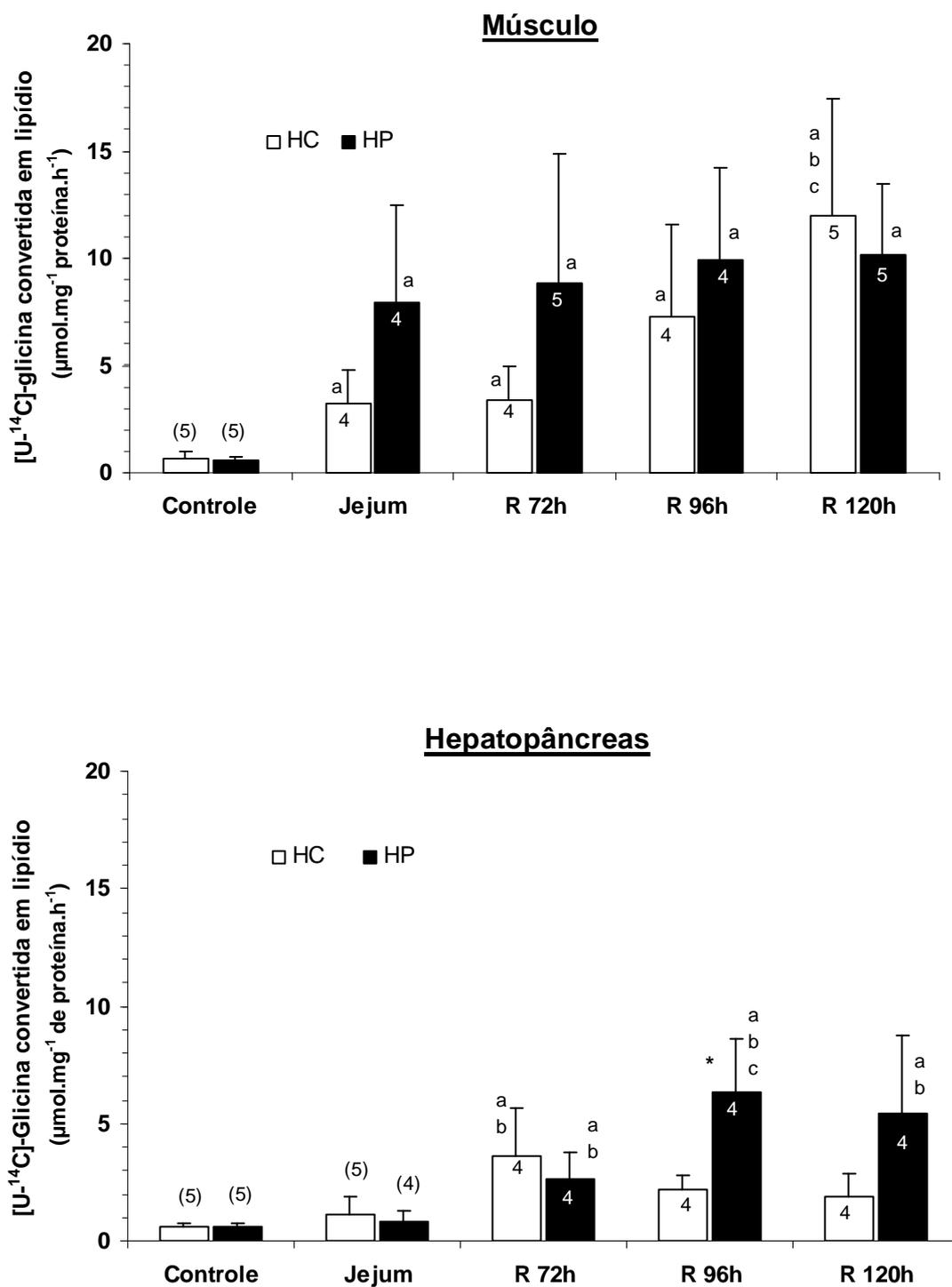


Figura 5. Efeito do jejum e da realimentação sobre a síntese de ¹⁴C-lipídios a partir de ¹⁴C-glicina no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R72h ($p < 0,05$); * diferença entre dietas ($p < 0,05$); (5), (4): número de animais.

No tecido muscular dos animais alimentados (controles) com a dieta HC os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina foram 1,7 vezes maiores ($p < 0,05$) quando comparados àqueles verificados no grupo de animais alimentados com a dieta HP. Após o período de jejum os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina diminuíram 56% ($p < 0,05$) nos animais alimentados com a dieta HC, mas retornaram aos valores do grupo controle às 72 h de realimentação. Contudo, após a realimentação por 96 e 120 h, a produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina diminuiu ($p < 0,05$), novamente, em relação aos valores verificados nos grupos controle e 72 h de realimentação (Figura 6).

No grupo de animais realimentados por 72 h com a dieta HC, os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina no tecido muscular foram 3,2 vezes maiores ($p < 0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HP (Figura 6).

No músculo, dos animais alimentados com a dieta HP, o jejum e os períodos de realimentação estudados não influenciaram, significativamente, os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina quando comparados àqueles verificados no grupo controle. Porém, foi constatada uma redução ($p > 0,05$), após a realimentação por 72 e 120 h em relação aos valores verificados no músculo do grupo controle HP (Figura 6).

No hepatopâncreas, a composição da dieta (controles) e o jejum não influenciaram os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina. Contudo, após a realimentação por 72 h a produção de $^{14}\text{CO}_2$ aumentou 2,1 vezes ($p < 0,05$) nos animais HC e 1,9 vezes ($p < 0,05$) nos animais HP em relação aos valores verificados nos respectivos grupos jejum. Após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HC os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ retornaram aos valores semelhantes aqueles verificados nos grupos controle e jejum. Na realimentação por 96 h com a dieta HP, os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ permaneceram

significativamente elevados em relação aos valores do grupo jejum HP, mas após 120 h de realimentação retornaram aos valores similares aqueles verificados nos grupos controle e jejum (Figura 6).

No grupo de animais realimentados por 96 h com a dieta HP, os níveis de produção de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina no hepatopâncreas foram 2,1 vezes maiores ($p < 0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 6).

Em ambas as dietas, HC e HP, os níveis de oxidação da ^{14}C -glicina foram maiores no tecido muscular, cerca de 8,0 e 6,3 vezes, respectivamente, quando comparados àqueles obtidos no hepatopâncreas (Figura 6).

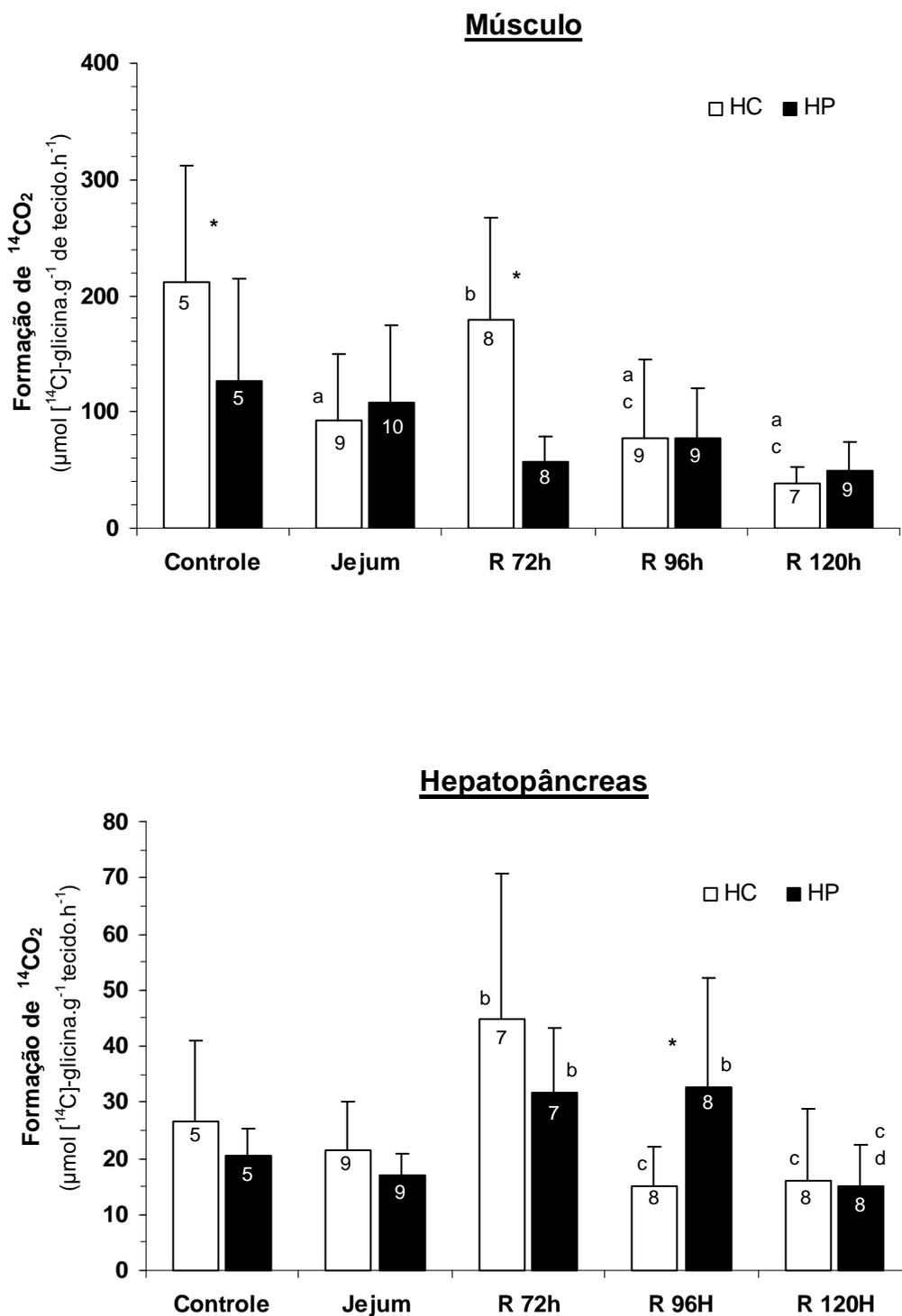


Figura 6. Efeito do jejum e da realimentação sobre a formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R 72h ($p < 0,05$); d: diferença em relação ao grupo R 96h ($p < 0,05$); * diferença entre dietas ($p < 0,05$).

A capacidade de sintetizar glicose a partir de ^{14}C -glicina no tecido muscular dos animais alimentados com a dieta HC foi 2,7 vezes maior ($p < 0,01$) em relação ao grupo HP. No grupo HC, os níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina não foram influenciados pelo período de jejum, mas após a realimentação por 72 h constatou-se uma redução de 67 e de 70% ($p < 0,05$) nos níveis de síntese encontrados nos grupos controle e jejum, respectivamente. Após 96 h de realimentação, os níveis retornaram aos valores verificados no grupo controle. Contudo, após 120 h de realimentação com a dieta HC, a capacidade de sintetizar glicose a partir de ^{14}C -glicina foi 4,5 vezes maior ($p < 0,05$) que a capacidade verificada no grupo controle (Figura 7).

No músculo dos animais submetidos à dieta HP, a capacidade de sintetizar glicose a partir de ^{14}C -glicina aumentou 2,8 vezes ($p < 0,05$) após o período de jejum, mas após 72 h de realimentação com a dieta HP os níveis retornaram aos valores do grupo controle. Contudo, após 96 h de realimentação, constatou-se novo aumento ($p < 0,05$) dos níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina (Figura 7).

No grupo de animais realimentados por 96 h com a dieta HP, os níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina no músculo foram 2,6 vezes maiores ($p < 0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 7).

A capacidade de sintetizar glicose a partir de ^{14}C -glicina no hepatopâncreas foi 5,3 vezes maior ($p < 0,01$) nos animais alimentados com a dieta HC, quando comparada àquela constatada no grupo HP. Nos animais HC, os níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina foram reduzidos em 53% ($p < 0,05$) após o período de jejum e em 80,3% ($p < 0,05$) após a realimentação por 72 h. Após a realimentação por 96 h com a dieta HC, os níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina retornaram a valores próximos aos do

grupo controle. Contudo, após 120 h de realimentação, a capacidade de sintetizar glicose a partir de ^{14}C -glicina foi 2,4 vezes maior ($p < 0,05$) que a capacidade verificada no grupo controle (Figura 7).

No hepatopâncreas dos animais submetidos à dieta HP, os níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina aumentaram 9,1 vezes ($p < 0,05$) durante o período de jejum, mas após a realimentação por 72 h com a dieta HP os níveis retornaram aos valores semelhantes àqueles do grupo controle. Contudo, após a realimentação por 96 h, constatou-se novo aumento ($p < 0,05$) na síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina no grupo alimentado com a dieta HP (Figura 7).

Nos animais previamente alimentados com a dieta HP, os níveis de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina no hepatopâncreas após o período de jejum foram 3,7 vezes maiores ($p < 0,05$) que os níveis verificados no mesmo período no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 7).

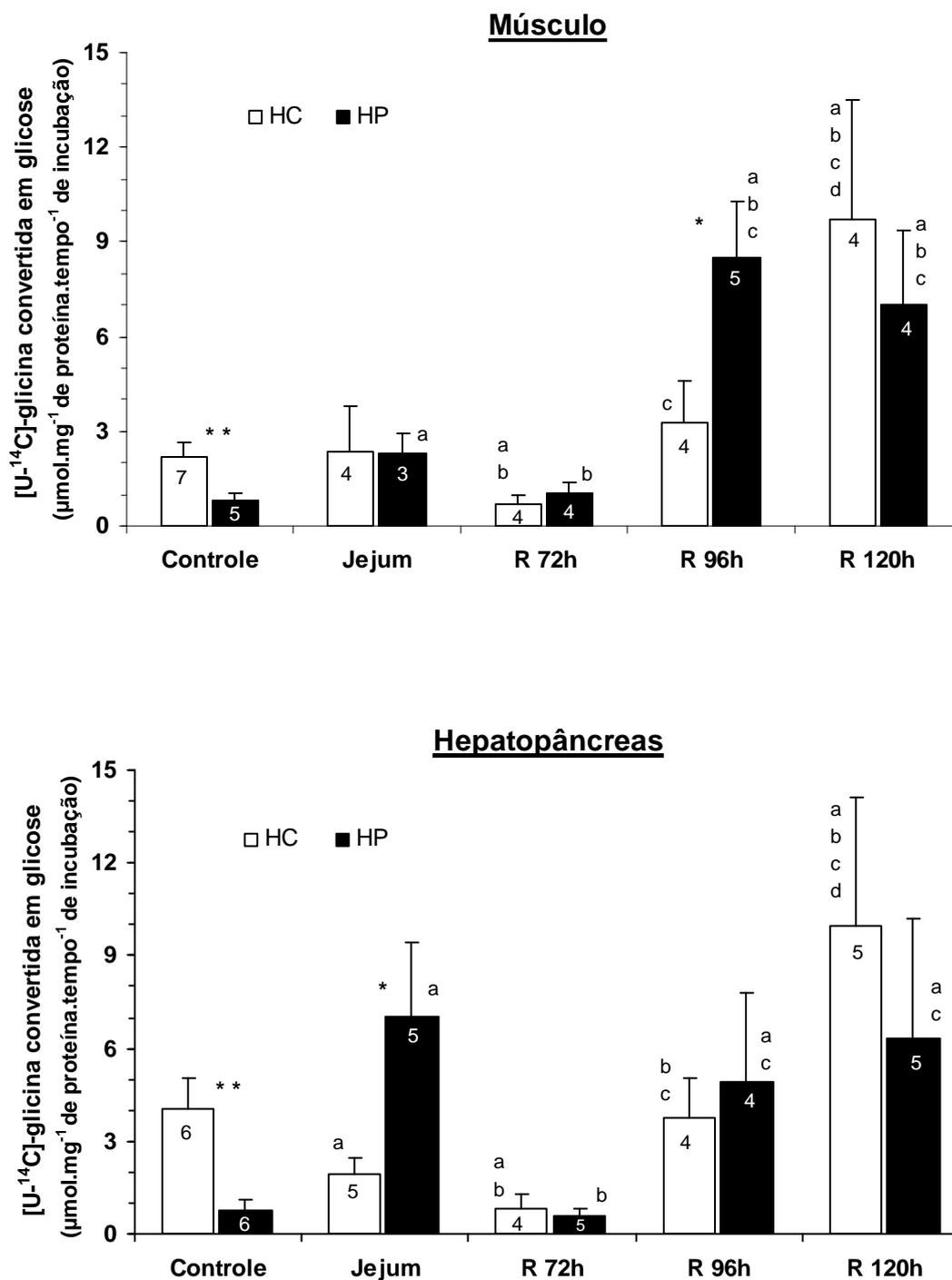


Figura 7. Efeito do jejum e da realimentação sobre a conversão de ^{14}C -glicina em ^{14}C -glicose no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R 72h ($p < 0,05$); d: diferença em relação ao grupo R 96h ($p < 0,05$); * diferença entre dietas ($p < 0,05$); ** diferença entre dietas ($p < 0,01$).

No grupo controle, a atividade da PEPCK no tecido muscular foi 3,3 vezes maior ($p < 0,01$) nos animais alimentados previamente com a dieta HP. Neste grupo, os níveis de atividade da PEPCK não foram modificados pelo período de jejum, mas após a realimentação por 72 h constatou-se uma redução de 51% ($p < 0,05$) em relação aos valores de atividade da enzima verificados nos grupos controle e jejum. Contudo, após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HP, os níveis de atividade da PEPCK retornaram aos valores semelhantes ao grupo controle (Figura 8).

Nos animais alimentados previamente com a dieta HC, os níveis de atividade da PEPCK no tecido muscular foram 3,12 vezes maiores ($p < 0,05$) após o período de jejum. Contudo, nos períodos de realimentação com a dieta HC, os níveis de atividade da PEPCK retornaram rapidamente aos valores verificados no grupo controle (Figura 8).

No grupo de animais realimentados por 72, 96 e 120 h com a dieta HP, os níveis de atividade da PEPCK no tecido muscular foram 2,1 ($p < 0,05$), 2,5 ($p < 0,05$) e 5,9 ($p < 0,01$) vezes maiores, respectivamente, que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 8).

Os níveis de atividade da PEPCK no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HP foram 5,0 vezes maiores ($p < 0,01$) quando comparados aqueles do grupo HC. No grupo HP, a atividade da PEPCK não foi influenciada significativamente pelo período de jejum, embora uma redução ($p > 0,05$) na atividade da PEPCK tenha sido constatada nesse período. Após 72 h de realimentação com a dieta HP, constatou-se uma redução de 60,6% ($p < 0,05$) na atividade da PEPCK em relação aos valores de atividade da enzima verificados no grupo controle. Contudo, após 96 e 120 h de realimentação com a

dieta HP, os níveis de atividade da PEPCK retornaram a valores semelhantes àqueles do grupo controle HP (Figura 8).

No grupo de animais realimentados por 96 e 120 h com a dieta HP, os níveis de atividade da PEPCK no hepatopâncreas foram 6,0 e 5,5 vezes maiores ($p < 0,01$), respectivamente, que os níveis verificados no grupo de animais realimentados com a dieta HC (Figura 8).

Nos animais alimentados previamente com a dieta HC, a atividade da PEPCK no hepatopâncreas foi 2,7 vezes maiores ($p < 0,05$) após o período de jejum. Os níveis de atividade da enzima permaneceram significativamente elevados após 72 h de realimentação com a dieta HC. Contudo, após os períodos de 96 e 120 h de realimentação, a atividade da PEPCK, no hepatopâncreas, retornou aos valores verificados no grupo controle HC (Figura 8).

No grupo de animais realimentados por 72 h com a dieta HC, os níveis de atividade da PEPCK no hepatopâncreas foram 1,7 vezes maiores ($p < 0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HP (Figura 8).

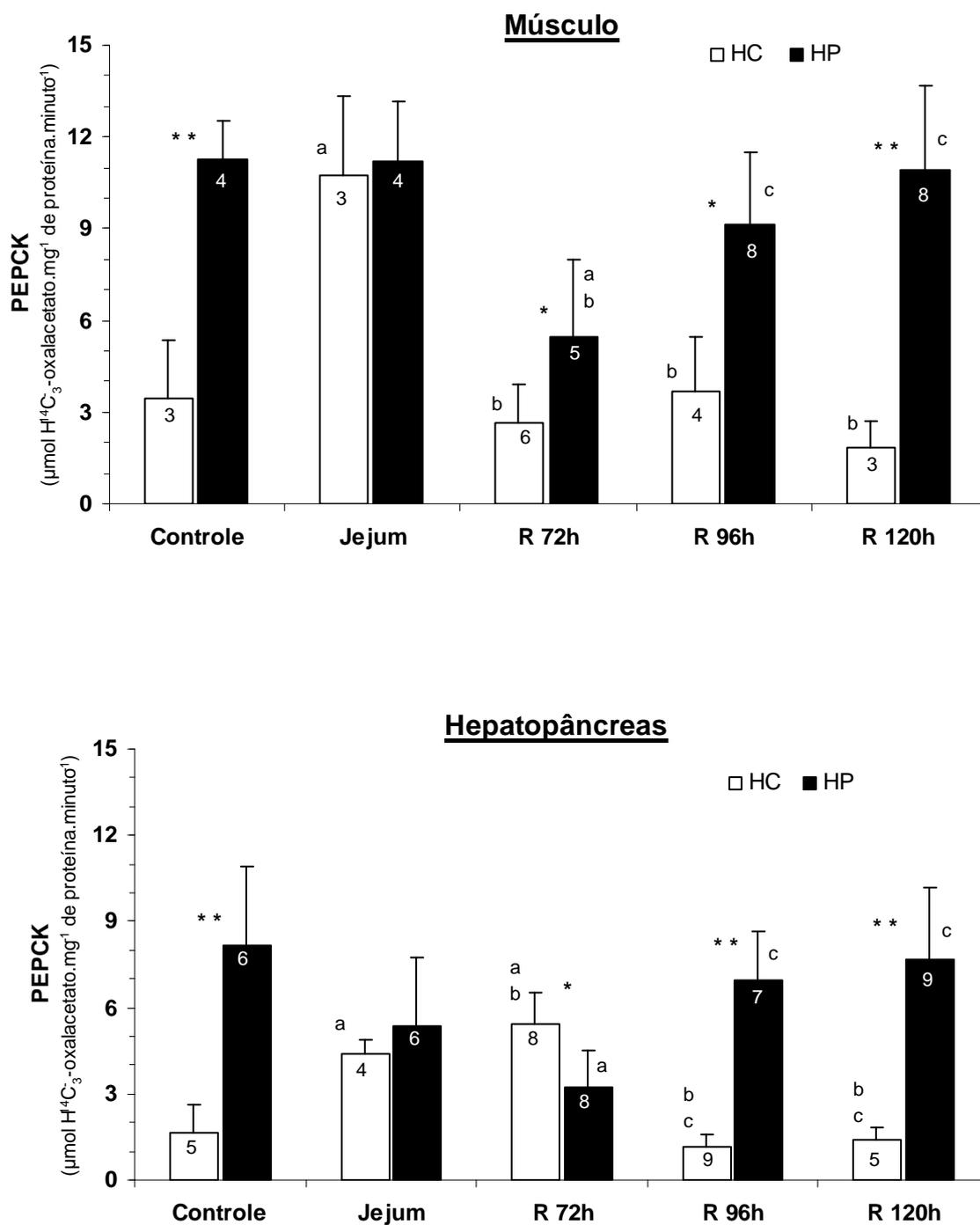


Figura 8. Efeito do jejum e da realimentação sobre a atividade da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); b: diferença em relação ao grupo jejum ($p < 0,05$); c: diferença em relação ao grupo R 72h ($p < 0,05$); * diferença entre dietas ($p < 0,05$); ** diferença entre dietas ($p < 0,01$).

O PCR do gene da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* analisado em gel de agarose está representado na Figura 9. O transcrito do gene da PEPCK foi relativizado pela expressão do 16S e os gráficos resultantes da análise densitométrica podem ser observados na Figura 10.

No tecido muscular dos grupos controles (HP e HC), a composição da dieta não influenciou significativamente os níveis de mRNA da PEPCK (Figura 10).

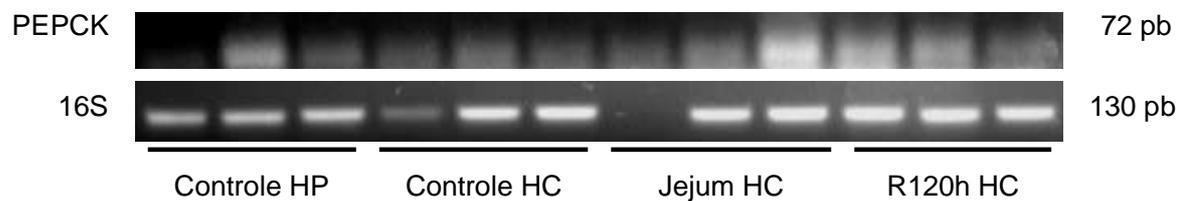
No músculo dos animais alimentados previamente com a dieta HC, o jejum e a realimentação por 120 h não modificaram significativamente os níveis de mRNA da PEPCK (Figura 10).

No hepatopâncreas, a composição da dieta não alterou, significativamente, os níveis de mRNA da PEPCK nos grupos controles (Figura 10).

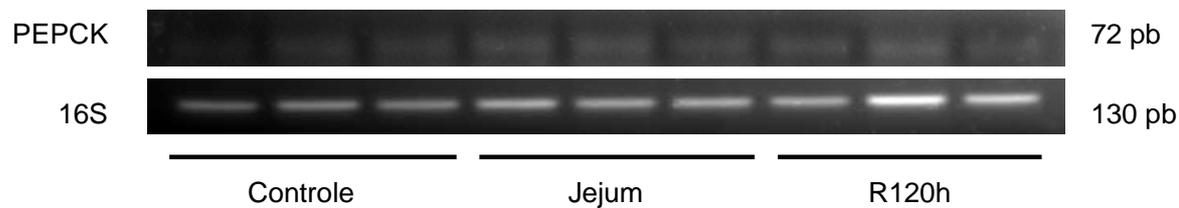
Nos animais alimentados previamente com a dieta HP os níveis de mRNA da PEPCK no hepatopâncreas não foram influenciados significativamente pelo período de jejum, embora uma redução ($p > 0,05$) tenha sido constatada nesse período. Após 120 h de realimentação com a dieta HP, os níveis de mRNA da PEPCK no hepatopâncreas retornaram aos valores verificados no grupo controle (Figura 10).

No grupo de animais realimentados por 120 h com a dieta HP, os níveis de mRNA da PEPCK no hepatopâncreas foram 1,9 vezes maiores ($p < 0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 10).

Músculo HP e HC



Hepatopâncreas HC



Hepatopâncreas HP

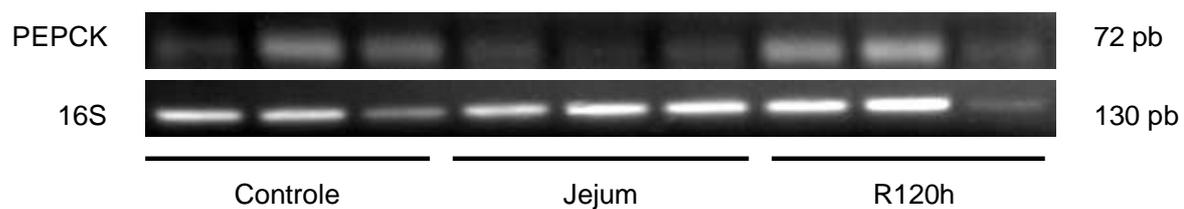


Figura 9. PCR do gene da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* analisado em gel de agarose. O fragmento amplificado corresponde ao transcrito do gene da PEPCK com 72 pb e do 16S com 130 pb.

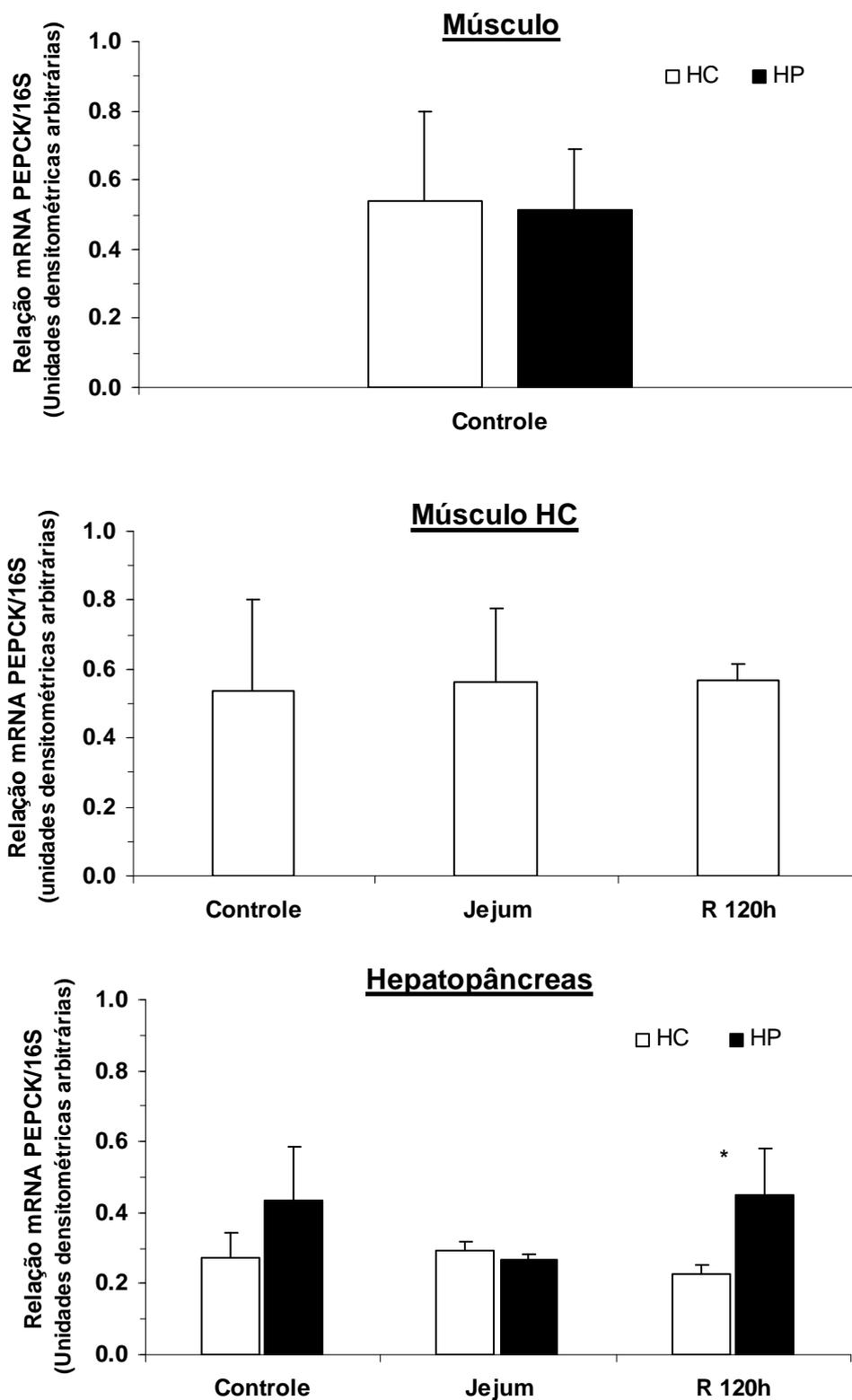


Figura 10. Efeito do jejum e da realimentação sobre a expressão da PEPCK no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. O transcrito do gene da PEPCK foi corrigido pela expressão do 16S; Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; * diferença entre dietas ($p < 0,05$); $n = 3$.

Os valores da atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foram 2,6 vezes maiores ($p<0,05$) no músculo dos animais alimentados previamente com a dieta HP, quando comparados aqueles verificados no grupo HC (Figura 11).

Nos animais submetidos à dieta HC, o jejum e os períodos de realimentação estudados não influenciaram os níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no tecido muscular.

Nos animais submetidos à dieta HP, o jejum e a realimentação por 72 h não influenciaram significativamente os níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no tecido muscular. Nos demais períodos de realimentação, por 96 e 120 h, constatou-se uma redução significativa de 56 e 51% ($p<0,05$), respectivamente, dos níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em relação aos valores verificados no grupo controle HP. Após o período de jejum, os níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no tecido muscular foram 2,2 vezes maiores ($p<0,05$) nos animais submetidos à dieta HP (Figura 11).

No hepatopâncreas, a dieta não modificou a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e, nos animais submetidos à dieta HC, o jejum e os períodos de realimentação estudados não influenciaram os níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nesse tecido (Figura 11). Após 96 h de realimentação com a dieta HP constatou-se uma diminuição de 58% ($p<0,05$) nos níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no hepatopâncreas. Contudo, após 120 h de realimentação, os níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ retornaram aos valores verificados no grupo controle HP (Figura 11).

No grupo de animais realimentados por 120 h com a dieta HC, os níveis de atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ no hepatopâncreas foram 2,0 vezes maiores ($p<0,05$) que os níveis verificados no grupo de animais submetidos à dieta HC (Figura 11).

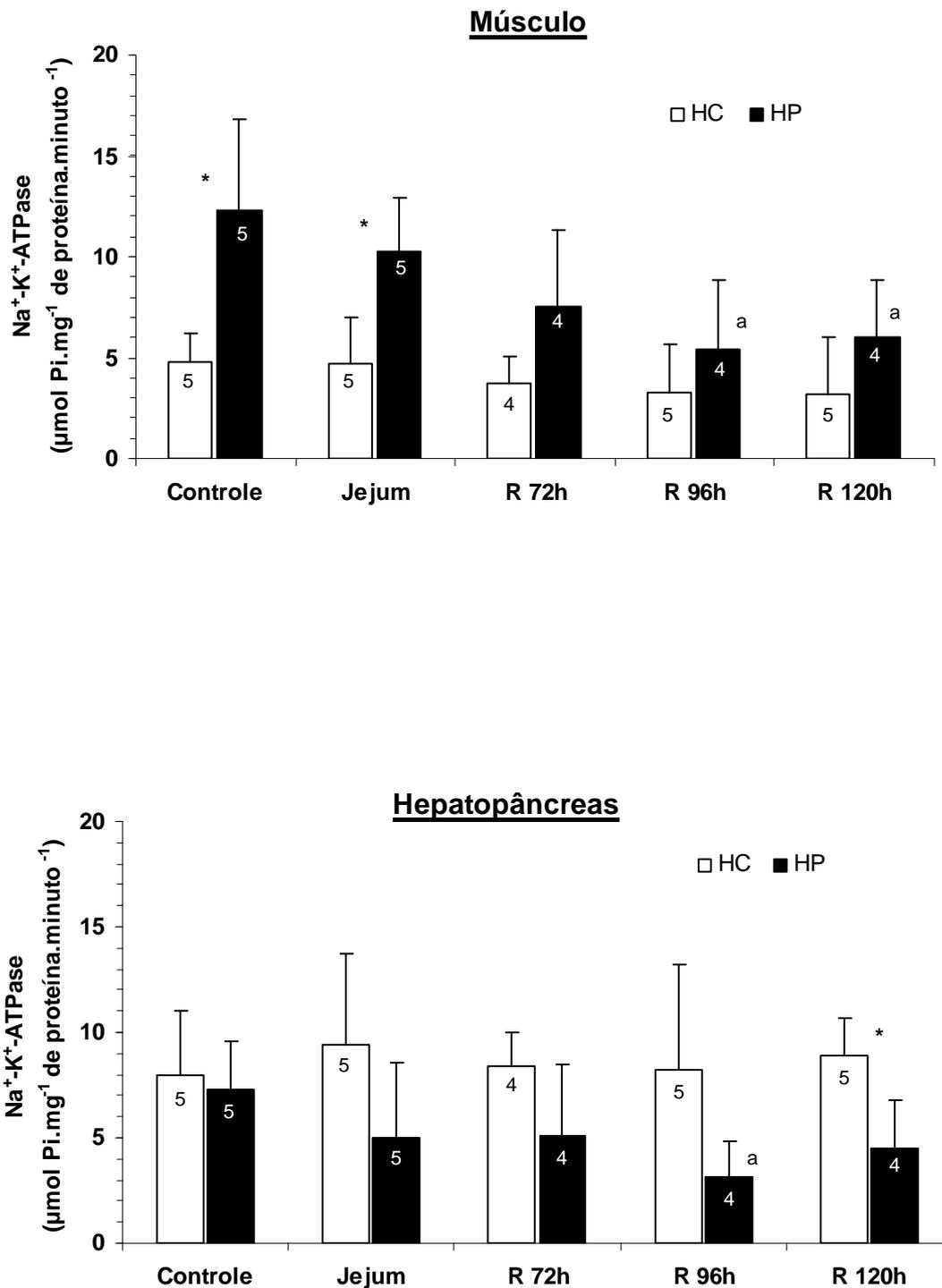


Figura 11. Efeito do jejum e da realimentação sobre a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase no músculo mandibular e no hepatopâncreas de *N. granulata* alimentado previamente com dieta HC ou HP. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão; número de animais indicado dentro das barras; a: diferença em relação ao grupo controle ($p < 0.05$); * diferença entre dietas ($p < 0.05$).

5. DISCUSSÃO

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que nos animais alimentados previamente com a dieta HC as reservas de glicogênio e as concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa são maiores em relação aos animais alimentados com a dieta HP (Kucharski; Da Silva, 1991a; Vinagre; Da Silva, 1992, 2002; Oliveira et al., 2004; Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008).

Neste estudo, a composição da dieta foi capaz de alterar as concentrações de proteínas e de glicogênio no hepatopâncreas, contudo, no músculo somente a concentração de glicogênio (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Além disso, a composição da dieta administrada aos caranguejos determinou, no hepatopâncreas e no músculo de animais no estado alimentado, um padrão diferenciado de utilização de aminoácidos pelas vias metabólicas estudadas.

A atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ foi, significativamente, menor no músculo dos animais que receberam a dieta HC em relação aqueles submetidos à dieta HP. Os resultados do presente estudo são concordantes com aqueles verificados em *Hyaella castroi* que receberam dieta com maior teor de carboidratos por 7-14 dias e apresentaram menor atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, comparada àquela verificada nos animais que receberam dieta com maior teor de proteínas (Gering et al., 2009). Estes autores sugerem que esta baixa atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ deva-se aos altos níveis de lipoperoxidação constatados neste grupo, ocasionando alterações na estrutura e na função da membrana (Gering et al., 2009). No presente trabalho, o método utilizado para a determinação da enzima foi o de Chan e Swaminathan (1986) que mede a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ sensível à ouabaína. Assim, não se pode descartar que nos animais

alimentados com a dieta HC a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ não sensível à ouabaína esteja elevada. A hipótese da presença de uma $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ insensível à ouabaína no músculo da mandíbula e no hepatopâncreas foi sugerida por Schein et al. (2005b). Recentemente, Pinoni e Mañanes (2009) constataram no músculo da quela de *N. granulata* a presença das enzimas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ insensível e sensível à ouabaína. No camarão *Litopenaeus vannamei* não foi constatada alteração significativa na concentração de mRNA da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ após 20 dias de dietas com diferentes concentrações de proteína (25% até 50%) (Erchao et al., 2011).

No presente estudo, no tecido muscular dos animais do grupo controle, a composição da dieta (HC ou HP) não influenciou significativamente a captação de ^{14}C -MeAIB e a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina. Contudo, no músculo dos caranguejos alimentados com a dieta HC foram constatados aumentos na capacidade de síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina e na formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -glicina pela via oxidativa.

A capacidade de síntese de ^{14}C -proteínas a partir de ^{14}C -leucina, no músculo mandibular dos animais alimentados com a dieta HP, foi marcadamente menor que nos caranguejos alimentados com a dieta HC. Em músculo esquelético de vertebrados, os aminoácidos ramificados como, a leucina, são oxidados à CO_2 (De Feo et al., 2003). Além disso, a oxidação destes aminoácidos aumenta quando as concentrações de glicogênio e de ATP neste tecido estão reduzidas (De Feo et al., 2003). Marqueze, Kucharski e Da Silva (2006) constataram que nos caranguejos *N. granulata* alimentados com a dieta HP os níveis de glicogênio e ATP são mais baixos quando comparados àqueles do grupo mantido com a dieta HC, sugerindo que no grupo HP a ^{14}C -leucina seria desviada da síntese de proteínas para a formação de ATP. Entretanto, experimentos que determinem a capacidade

de oxidação da ^{14}C -leucina em músculo de *N. granulata* alimentado com a dieta HP ou HC serão necessários para esclarecer esta hipótese.

Neste estudo, os níveis de incorporação do ^{14}C da glicina em $^{14}\text{CO}_2$ foram menores no músculo dos animais alimentados com a dieta HP, quando comparados àqueles verificados nos caranguejos mantidos com a dieta HC. Essa diminuição pode ser explicada pela alta formação de $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ^{14}C -lactato verificada em músculo de *N. granulata* alimentado com a dieta HP, nestes animais a relação lactato/glicose na hemolinfa é de 1,35 (Marqueze; Kucharski; Da Silva, 2006; Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Outra hipótese seria a utilização preferencial de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) (Newsholme; Leech, 1983; De Feo et al., 2003) como fonte de energia no músculo dos caranguejos alimentados com a dieta HP.

O padrão de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina em resposta às dietas HC e HP é similar no músculo e no hepatopâncreas. Entretanto, nos dois tecidos a atividade da enzima PEPCK é maior no grupo HP. Porém, não foram verificadas alterações significativas na expressão da enzima. Estes achados são semelhantes àqueles observados em *Cyprinus carpio* e *Sparus aurata* onde os carboidratos da dieta diminuíram a expressão das enzimas gliconeogênicas no fígado (Panserat; Plagnes-Juan; Kaushik, 2002). Porém, nos peixes juvenis, *Dicentrarchus labrax* e *Sparus aurata* L., os carboidratos da dieta não inibiram as atividades das enzimas gliconeogênicas (Enes et al., 2011). No hepatopâncreas e no músculo dos animais alimentados com a dieta HC foi constatada maior capacidade de síntese e de liberação de glicose a partir de ^{14}C -glicina. Contudo, em *N. granulata*, experimentos anteriores em nosso laboratório demonstraram que a síntese de glicose a partir de ^{14}C -lactato ou de ^{14}C -alanina no hepatopâncreas não foi influenciada pela composição da dieta (Oliveira; Da Silva, 1997). No músculo de *N. granulata*, a utilização

de ^{14}C -lactato como precursor da via gliconeogênica foi maior em caranguejos alimentados com a dieta HC (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Esses dados sugerem que, no hepatopâncreas e no músculo dos animais submetidos à dieta HC, a ^{14}C -glicina constitui um importante substrato para a via gliconeogênica. Esta diferença na utilização do substrato pela via gliconeogênica hepatopancreática e muscular pode ser explicada, em parte, pela alta concentração circulante de glicina constatada na hemolinfa de *N. granulata* (Schein, 1999). Como os experimentos *in vitro* servem para avaliar a capacidade intrínseca de síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina, os resultados do presente trabalho sugerem que a dieta HC não requer um aumento da capacidade da via para a síntese de glicose no hepatopâncreas e no músculo. Esta suposição é corroborada pela baixa atividade e não alteração na expressão da enzima PEPCCK no hepatopâncreas e no músculo dos caranguejos alimentados com a dieta HC.

A maior atividade da PEPCCK constatada no hepatopâncreas (5 vezes maior) dos animais alimentados com a dieta HP, em contraste aos animais submetidos à dieta HC, é também acompanhada pela expressão da PEPCCK, 1,6 vezes maior no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HP (Figura 10). No músculo dos animais que receberam a dieta HP também foi verificada maior atividade da enzima PEPCCK (Figura 8), entretanto, a expressão não foi alterada, após a administração por 15 dias de dieta HP. Em outro crustáceo, o camarão *L. vannamei*, a capacidade gliconeogênica hepatopancreática foi modulada pela alimentação, com alta atividade da PEPCCK em camarões submetidos à dieta pobre em carboidratos (Rosas et al., 2001). No presente trabalho com a dieta HP, nos dois tecidos estudados, a síntese de glicose a partir de ^{14}C -glicina foi marcadamente menor que nos animais HC. No grupo HP a concentração de glicogênio no músculo e no hepatopâncreas é significativamente mais baixa, quando comparada ao grupo HC

(Vinagre; Da Silva, 1992; Oliveira et al., 2004; Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). No presente trabalho o método de determinação da atividade gliconeogênica avalia a ^{14}C -glicose produzida e liberada para o meio de incubação. No hepatopâncreas e no músculo do grupo HP o ^{14}C da glicina seria incorporado em ^{14}C -glicogênio, justificando a menor formação de ^{14}C -glicose liberada para o meio de incubação. Esta hipótese é reforçada pela elevada atividade e expressão da PEPCCK no hepatopâncreas e elevada atividade enzimática no músculo.

Outra explicação para a menor produção de ^{14}C -glicose nos tecidos do grupo HP seria o desvio da ^{14}C -glicina para a síntese de lipídios via gliceroneogênese (Hanson; Heshef, 2003). Esta via foi constatada por Martins et al. (2011) que encontraram aumento simultâneo da síntese de ^{14}C -lipídios e da atividade da PEPCCK em brânquias anteriores de *N. granulata* submetido ao estresse hiposmótico. Contudo, para comprovar esta hipótese serão necessários experimentos que determinem a incorporação de ^{14}C -2-piruvato em ^{14}C -glicerol-3-fosfato e ^{14}C -triacilglicerol. Em ratos, Colleen et al. (2008) demonstraram que o músculo esquelético possui capacidade gliceroneogênica.

Os lipídios constituem reserva energética importante no tecido muscular, uma vez que nesse caranguejo está ausente um tecido adiposo diferenciado (Kucharski; Da Silva, 1991a). É importante destacar que não foram encontradas diferenças nas concentrações de lipídios totais no músculo e no hepatopâncreas de *N. granulata* submetidos às dietas HC e HP (Kucharski; Da Silva, 1991a; Vinagre; Da Silva, 1992) e, nesse caranguejo, o glicogênio muscular parece ser o principal substrato energético utilizado nos meses de verão, contudo, no inverno os lipídios musculares são mobilizados (Kucharski; Da Silva, 1991b).

Neste estudo, os dados verificados nos animais alimentados com diferentes dietas, corroboram investigações prévias de que o caranguejo *N. granulata* consome com facilidade diferentes dietas (Kucharski; Da Silva, 1991a), além de evidenciar, no músculo mandibular e no hepatopâncreas, os possíveis ajustes nos processos de síntese e/ou degradação dos substratos fornecidos pela dieta e, dessa forma, manter o metabolismo energético no estado alimentado.

Animais em jejum podem apresentar respostas características de determinados metabólitos circulantes. Porém, estas respostas são frequentemente espécie específica e podem demonstrar grande variabilidade intra-individual (McCue, 2010) e tecido específica.

Em estudos anteriores, o período de 15 dias de jejum diminuiu os níveis de glicose e de lactato na hemolinfa e o conteúdo de glicogênio muscular nos caranguejos submetidos previamente à dieta HC. Contudo, em ambas as dietas, HC e HP, a homeostase metabólica dos caranguejos não foi comprometida pelo jejum (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008).

No presente trabalho, o conteúdo de proteínas no tecido muscular dos animais de ambas as dietas não foi, significativamente, influenciado pelo jejum. Contudo, no hepatopâncreas dos animais submetidos previamente à dieta HC, o conteúdo de proteínas aumentou significativamente após o período de jejum, enquanto que no hepatopâncreas dos animais submetidos previamente à dieta HP os conteúdos de proteínas e de glicogênio diminuíram significativamente após o período de jejum. Uma explicação para esse achado, no grupo HC, pode ser a maior utilização de glicogênio como substrato energético e a manutenção da capacidade de síntese de proteínas, o que diminuiria a

degradação das proteínas levando ao acúmulo desse substrato nesse tecido. Já no grupo HP, os níveis de glicogênio foram 3 vezes menores que os níveis encontrados no grupo HC aos 15 dias de jejum o que levaria a mobilização de proteínas como substrato energético, uma vez que o aporte de aminoácidos pela dieta foi interrompido. Nesse grupo a oxidação de ^{14}C -glicina no jejum é semelhante àquela do grupo alimentado.

No músculo dos caranguejos alimentados previamente com a dieta HC, o período de 15 dias de jejum reduziu significativamente a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina e a oxidação de ^{14}C -glicina. A captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB), a atividade da Na^+ - K^+ -ATPase e a capacidade gliconeogênica, no tecido muscular desses animais, não foram influenciadas significativamente pelo jejum. Contudo, constatou-se aumento significativo na síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina e na atividade da PEPCK no músculo desses animais após o período de jejum.

No músculo dos animais alimentados previamente com a dieta HP, o período de jejum também aumentou significativamente a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina e estimulou de forma significativa a capacidade da via gliconeogênica. Contudo, a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB), a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, a oxidação de ^{14}C -glicina e as atividades da PEPCK e da Na^+ - K^+ -ATPase, no tecido muscular desses animais, não foram modificadas significativamente após o período de jejum. Esses resultados sugerem que, após o período de jejum, o fluxo do ^{14}C da glicina no músculo mandibular de *N. granulata* é redirecionado conforme a composição da dieta previamente administrada ao caranguejo. No grupo HC a ^{14}C -glicina constitui substrato para a via gliceroneogênica (Hanson; Heshef, 2003), e no grupo HP para a via gliconeogênica. Em ambas as dietas constata-se alta atividade da PEPCK no período de

jejum. Contudo, uma avaliação da atividade da PEPCKc será necessária para confirmar a participação da via gliconeogênica.

Em *N. granulata*, o período de jejum de duas semanas aumentou significativamente os níveis de lipídios totais na hemolinfa dos animais alimentados previamente com ambas as dietas, HC e HP (Vinagre; Da Silva, 1992). Estes achados sustentam a participação da via gliconeogênica.

Os lipídios exibem algumas vantagens sobre outras classes de macromoléculas como combustíveis fisiológicos - requerem baixo conteúdo de água para armazenamento, têm alta densidade de energia e apresentam uma demanda metabólica relativamente baixa (Cahill, 1976).

O período de jejum não afetou significativamente a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase e a captação de aminoácidos (¹⁴C-MeAIB) no músculo dos animais alimentados previamente com a dieta HP ou HC. Estes dados sugerem que durante o jejum de 15 dias não ocorreu uma depressão metabólica nestes animais, mas sim uma alteração do fluxo de carbono entre as diferentes vias metabólicas.

No músculo do grupo HC, após o período de 15 dias de jejum, foi constatada redução na síntese de proteínas a partir de ¹⁴C-leucina e na oxidação da ¹⁴C-glicina. Talvez essa redução seja uma estratégia metabólica para redirecionar o ATP durante o período de jejum. No grupo HC a relação lactato/glicose no estado alimentado é alta (1,8) e após o jejum a concentração do lactato circulante diminui, mas a relação permanece elevada sugerindo que o lactato seria oxidado (Pellegrino; Kucharski; Da Silva,

2008); o que explicaria, em parte, a redução na oxidação de glicina observada no músculo dos animais alimentados com a dieta HC após o jejum.

Em ambas as dietas, o processo jejum/realimentação não modificou a concentração de proteínas no tecido muscular. Resultados semelhantes foram encontrados em dois crustáceos subterrâneos *Niphargus rhenorhodanensis* e *Niphargus virei* que, submetidos ao jejum prolongado, apresentaram uma utilização seletiva da proteína muscular, poupando as proteínas para funções essenciais como a locomoção (Hervant; Mathieu; Barre, 1999). Em duas espécies de lagostim (*Parastacus defossus* e *Parastacus brasiliensis*) nenhuma variação significativa nos níveis de proteínas foi observada no período de recuperação da hipoxia (Silva-Castiglioni; Oliveira; Buckup, 2011).

Animais em jejum eventualmente apresentam balanço negativo de proteína onde a degradação supera a síntese de proteínas. Alguns animais demonstram estratégias fisiológicas “criativas” para reciclar proteínas endógenas, reduzem o requerimento gliconeogênico ou outra forma que minimize as perdas de proteína durante o jejum (McCue, 2010).

No hepatopâncreas de *N. granulata* alimentados com a dieta HC, uma redução na síntese de glicose a partir de ^{14}C -lactato foi observada após o período de 15 dias de jejum (Oliveira et al., 2004). Entretanto, esses autores constataram um aumento na capacidade de síntese de ^{14}C -glicose a partir de ^{14}C -alanina no tecido hepatopancreático após 15 dias de jejum. No presente trabalho, utilizando ^{14}C -glicina como substrato marcado obteve-se uma redução marcante na capacidade de síntese de glicose no hepatopâncreas dos caranguejos previamente alimentados com a dieta HC, sugerindo que o aumento da síntese de glicose via ^{14}C -alanina seria via ciclo alanina-glicose durante o

jejum. Esta suposição é reforçada pelo aumento significativo na atividade da PEPCK no hepatopâncreas desses animais após o período de jejum. Pascual et al. (2006) observaram que 21 dias de jejum aumentam a concentração de glicogênio em hepatopâncreas de *L. vannamei* previamente alimentado com dieta rica em carboidrato e sugerem que seria via gliconeogênese. A atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina, a oxidação de ^{14}C -glicina, a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB) e a expressão da PEPCK não foram influenciadas significativamente pelo jejum.

No hepatopâncreas dos animais alimentados previamente com a dieta HP, o período de jejum aumentou significativamente a capacidade gliconeogênica. Oliveira et al. (2004) utilizando ^{14}C -alanina como substrato também observaram um aumento marcante da síntese de glicose após 15 dias de jejum. A captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB), a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina, a oxidação de ^{14}C -glicina e a atividade e a expressão da PEPCK não foram influenciadas significativamente pelo jejum.

O ajuste metabólico que ocorre na realimentação é diferente daqueles constatados no jejum e no estado alimentado. O ajuste da realimentação é caracterizado por estímulo dos processos de síntese e, em algumas espécies de animais, um longo período é necessário para que o padrão metabólico do estado alimentado seja atingido (Hervant et al., 1999).

No músculo dos animais alimentados com a dieta HC, a realimentação por 72 h reduziu significativamente a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB) e a capacidade gliconeogênica em relação aos grupos alimentado e jejum. A atividade da PEPCK foi

reduzida, retornando aos valores do estado alimentado às 72 h de realimentação, permanecendo assim nos demais períodos de realimentação estudados. A síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina e a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina mantiveram valores similares aos observados após o período de jejum. Contudo, os níveis de oxidação de ^{14}C -glicina retornaram aos valores do estado alimentado às 72 h de realimentação.

Em outro estudo, a realimentação por 72 h com a dieta HC, após o período de restrição alimentar, aumentou as concentrações de glicose e de lactato na hemolinfa e os níveis de glicogênio no músculo mandibular em relação ao período de jejum (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008), sugerindo que os aminoácidos sejam preferencialmente direcionados à produção de ATP, conforme constatado pelo aumento nas reações de oxidação desse substrato. Embora, uma parte desses aminoácidos tenha sido direcionada à síntese de lipídios via gliconeogênese ou via lipogênese, pois, após a realimentação por 72 h com a dieta HC os níveis de formação de lipídios a partir de ^{14}C -glicina mantiveram o aumento verificado no período de jejum, a capacidade gliconeogênica estava reduzida e a atividade da PEPCK foi similar ao grupo controle nesse período. Esta redução pode ser explicada pelo aporte de glicose nas células musculares, inibindo assim, a via gliconeogênica. Estudos com ^{14}C -2-piruvato seriam interessantes para esclarecer esse ponto.

Esses resultados demonstram que a realimentação por 72 h, nos animais submetidos à dieta HC, diminuiu o influxo de aminoácidos no músculo mandibular e foi capaz de ajustar o metabolismo dos aminoácidos para a recuperação das reservas energéticas reduzidas no período de jejum. Durante todos os períodos de realimentação estudados com a dieta HC, os valores de captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB) permaneceram significativamente inferiores aos valores dos grupos alimentado e jejum.

Este fato pode ser explicado pela composição da dieta HC, que apresenta baixa concentração de proteínas.

Após o período de 96 h de realimentação com a dieta HC, a oxidação de ^{14}C -glicina no músculo mandibular foi significativamente reduzida. Uma diminuição na concentração de glicose na hemolinfa também foi verificada nesse período em relação ao elevado aumento observado às 72 h de realimentação com a dieta HC (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Esses dados sugerem que, na realimentação por 96 h, o músculo mandibular aumente a oxidação de glicose, uma vez que, durante a realimentação por 72 h, o conteúdo de glicogênio já atingiu os níveis do grupo alimentado e a síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -lactato estava elevada (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Por outro lado, a manutenção do aumento na síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina no tecido muscular, iniciado às 72 h de realimentação, foi acompanhada por um aumento significativo na capacidade gliconeogênica às 96 h de realimentação com a dieta HC em relação às 72 h. Este aumento, provavelmente, ocorra devido à redução da concentração de glicose nestas células.

No músculo, o período de 120 h de realimentação com a dieta HC reduziu de forma marcante a oxidação da ^{14}C -glicina e aumentou significativamente a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, atingindo níveis semelhantes ao do grupo alimentado. Esta reorganização metabólica gerou um aumento expressivo na síntese de glicose e de lipídios a partir de ^{14}C -glicina. Nesse período de 120 h de realimentação com a dieta HC, os animais atingiram o padrão metabólico do estado alimentado, onde os níveis de glicose e de lactato na hemolinfa e o conteúdo de glicogênio muscular estão similares ao grupo controle (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008).

Na realimentação por 72 h com a dieta HC, os níveis da oxidação da ^{14}C -glicina no tecido muscular foram 3,2 vezes maiores que os níveis verificados no músculo dos animais do grupo HP. Contudo, nos demais períodos de realimentação, 96 e 120 h, os níveis de oxidação da ^{14}C -glicina diminuíram significativamente. Esses dados sugerem a possível oxidação predominante dos aminoácidos de cadeia ramificada pelo tecido muscular, mencionado anteriormente.

No músculo dos animais realimentados com a dieta HP por 72 horas ocorreu uma redução significativa na capacidade gliconeogênica em contraste aos níveis verificados no grupo jejum, os valores de síntese de glicose às 72 h de realimentação são similares àqueles dos controles. Os níveis da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB), a capacidade de síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina e a oxidação de ^{14}C -glicina, em relação aos grupos controle e jejum, não foram significativamente modificados às 72 h de realimentação com a dieta HP. O aumento significativo nos níveis de formação de lipídios a partir de ^{14}C -glicina, constatados no período de jejum, permaneceu em todos os períodos de realimentação com a dieta HP. Contudo, a atividade da PEPCCK foi significativamente reduzida às 72 h de realimentação com a dieta HP, em relação aos grupos controle e jejum, sugerindo que a síntese de lipídios seja via lipogênese. Contudo, para confirmar esta hipótese será necessária a dosagem da atividade da enzima glicerol quinase.

Em outro estudo com *N. granulata*, a realimentação por 72 h com a dieta HP não modificou as concentrações de glicose circulante, mas reduziu as concentrações de lactato na hemolinfa, atingindo os valores do grupo alimentado, permanecendo sem alterações nos demais períodos de realimentação estudados (96 e 120 h). Além disso, a alta atividade na síntese de glicogênio a partir de ^{14}C -lactato, provavelmente, elevou o

conteúdo de glicogênio no músculo mandibular (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Esses resultados sugerem que, após a realimentação por 72 h com a dieta HP, a síntese de lipídios seja a principal via metabólica para a cadeia de carbono da ^{14}C -glicina no músculo mandibular.

No músculo, o período de 96 h de realimentação com a dieta HP não modificou a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB) em relação aos grupos alimentado, jejum e 72 h, mas essa atividade foi significativamente reduzida após 120 h de realimentação. Por outro lado, os períodos de 96 e 120 h de realimentação com a dieta HP aumentaram a capacidade gliconeogênica e reduziram a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Nesse período, os níveis de atividade da PEPCCK aumentaram significativamente em relação ao grupo realimentado 72 h, retornando aos níveis verificados no grupo controle.

Em outro estudo, com *N. granulata*, a realimentação por 96 h com a dieta HP diminuiu significativamente a concentração de glicose na hemolinfa e a concentração de glicogênio no músculo mandibular, atingindo valores do grupo alimentado e permanecendo assim após o período de 120 h de realimentação. Contudo, a concentração de glicose na hemolinfa voltou a aumentar após o período de 120 h de realimentação em relação aos demais grupos (Pellegrino; Kucharski; Da Silva, 2008). Em caranguejos alimentados com a dieta HP, a realimentação por 48 h aumentou a formação de glicose a partir de ^{14}C -glicina no músculo da quela e aumentou a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicose no hepatopâncreas (Vinagre; Da Silva, 2002).

Esses resultados sugerem que, após a realimentação por 96 e 120 h com a dieta HP, a síntese de lipídios e de glicose (gliconeogênese) constituam as vias metabólicas predominantes para a cadeia de carbono dos aminoácidos no músculo mandibular.

No hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HC a realimentação por 72 h aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio em relação aos valores dos grupos controle e jejum e permaneceu elevado após os demais períodos de realimentação. O aumento no conteúdo de proteínas constatado após o período de jejum no hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HC permaneceu inalterado por todos os períodos de realimentação estudados.

A captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB) diminuiu significativamente no hepatopâncreas dos animais realimentados por 72 h com a dieta HC quando comparada ao grupo em jejum. A capacidade gliconeogênica também diminuiu significativamente nesse período. Contudo, a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina, a oxidação de ^{14}C -glicina e a atividade da PEPCK aumentaram significativamente no hepatopâncreas no período de 72 h de realimentação com a dieta HC. Esses resultados demonstraram que 72 h de realimentação com a dieta HC constituíram o período de tempo necessário para recuperação total do conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas e sugerem que o aminoácido glicina seja um importante substrato para a síntese de lipídios nesse tecido após 72 h de realimentação com a dieta HC. Embora o aumento significativo na síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, constatado a partir das 72 de realimentação com a dieta HC, também indique uma via metabólica para os aminoácidos nesse tecido. Deve ser observado que a capacidade para oxidar ^{14}C -glicina no hepatopâncreas dos animais de ambas as dietas é cerca de 7,0 vezes menor que a verificada no músculo mandibular desses animais (Figura 6).

No hepatopâncreas, a realimentação por 96 e 120 h com a dieta HC a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB), a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina, a oxidação de ^{14}C -glicina e a atividade da PEPCK retornaram a valores similares aqueles dos

respectivos grupos controle. Contudo, a capacidade gliconeogênica voltou a aumentar significativamente e a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina permaneceu significativamente elevada em relação aos grupos controle e jejum. Esses resultados demonstram que a capacidade endergônica de síntese estimulada pelo processo jejum/realimentação persistiu no hepatopâncreas após 120 h de realimentação com a dieta HC e sugerem que a principal via metabólica dos aminoácidos no hepatopâncreas, após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HC, seja a síntese de proteínas e de glicose. Como mencionado anteriormente, esse grupo de animais não modificou os níveis de atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ao longo do tratamento experimental, sugerindo que os processos de síntese constatadas na realimentação não requerem um aumento na atividade desta enzima.

No hepatopâncreas dos animais alimentados com a dieta HP, 72 h de realimentação aumentaram significativamente o conteúdo de glicogênio e de proteínas em relação aos níveis verificados nos respectivos grupos jejum, atingindo valores similares aos verificados nos grupos controle e permanecendo assim nos demais períodos de realimentação.

Os períodos de realimentação estudados, assim como o jejum, não influenciaram significativamente a captação de aminoácidos (^{14}C -MeAIB) no hepatopâncreas dos animais alimentados previamente com a dieta HP. A oxidação de ^{14}C -glicina, a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina e a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina aumentaram significativamente no hepatopâncreas desses animais às 72 h de realimentação. Contudo, a capacidade gliconeogênica e a atividade da PEPCCK, no hepatopâncreas, foram significativamente reduzidas às 72 h de realimentação com a dieta HP. Esses resultados demonstraram que 72 h de realimentação com a dieta HP foram suficientes para restabelecer os conteúdos de proteínas e de glicogênio reduzidos pelo

período de jejum no hepatopâncreas e sugerem que a síntese de proteínas e de lipídios constitua as principais vias metabólicas dos aminoácidos no hepatopâncreas às 72 de realimentação com a dieta HP.

No hepatopâncreas, após a realimentação por 96 e 120 h com a dieta HP foi constatado um aumento significativo na capacidade gliconeogênica e na atividade da PEPCCK em relação às 72 h de realimentação com essa dieta. A expressão da PEPCCK no hepatopâncreas dos animais realimentados por 120 h com a dieta HP foi 2,0 vezes maior que a verificada nos animais do grupo HC. Nesse tecido, a síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina e a síntese de lipídios a partir de ^{14}C -glicina permaneceram significativamente elevadas após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HP. A oxidação de ^{14}C -glicina também permaneceu significativamente elevada às 96 h de realimentação com a dieta HP, mas retornou a valores similares ao grupo controle após 120 h de realimentação. Esses resultados sugerem que, além da utilização dos aminoácidos para a síntese de proteínas e de lipídios observados às 72 h de realimentação no hepatopâncreas do grupo HP, a síntese de glicose torna-se, também, uma importante via metabólica para os aminoácidos após 96 e 120 h de realimentação. Além disso, esses resultados demonstram que o estímulo gerado pelo processo jejum/realimentação persiste no hepatopâncreas após 120 h de realimentação com a dieta HP.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os dados verificados nos animais alimentados com diferentes dietas corroboram investigações prévias de que o caranguejo *N. granulata* consome com facilidade diferentes dietas e evidenciam, no músculo mandibular e no hepatopâncreas, possíveis ajustes nos processos metabólicos dos substratos fornecidos pela dieta para a manutenção energética no estado alimentado.

Conforme a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo o substrato ^{14}C -glicina é utilizado por diferentes vias no estado alimentado, no jejum e durante a realimentação. A composição da dieta foi capaz de influenciar, significativamente, os conteúdos de proteína e de glicogênio no hepatopâncreas desses animais, além de promover alterações nas atividades da PEPCCK e da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$.

Em ambas as dietas, o processo jejum/realimentação não modificou a concentração de proteínas no tecido muscular.

No músculo dos animais controle HC, os aminoácidos constituíram substratos para a síntese de lipídios, de proteínas e de glicose. No hepatopâncreas desses animais o aminoácido ^{14}C -glicina constituiu um importante substrato para a via gliconeogênica, confirmando a alta capacidade gliconeogênica hepatopancreática em *N. granulata*. Contudo, em animais mantidos com a dieta HP foi constatada uma alta atividade da PEPCCK muscular e hepatopancreática. Estes dados reforçam a capacidade que o caranguejo *N. granulata* apresenta frente às adversidades do seu habitat.

No jejum, o músculo mandibular dos caranguejos de ambas as dietas aumentou a capacidade de síntese de lipídios e de glicose a partir de ^{14}C -glicina. No músculo dos animais do grupo HC o lactato e a glicose seriam os principais substratos

utilizados para regenerar moléculas de ATP. Enquanto no músculo dos animais submetidos à dieta HP, os aminoácidos seriam os principais substratos energéticos.

No hepatopâncreas dos animais de ambas as dietas, durante o jejum, a principal via metabólica dos aminoácidos seria a gliconeogênese. Contudo, no hepatopâncreas do grupo HC a ^{14}C -glicina não parece ser o principal substrato para a síntese de glicose, sugerindo que ^{14}C -alanina seja preferencialmente utilizada nesse período. Nesses animais, o lactato e a glicose parecem ser os principais substratos energéticos utilizados pelo hepatopâncreas durante o jejum. Nos animais do grupo HP, o glicogênio e os aminoácidos seriam os principais substratos energéticos utilizados pelo hepatopâncreas durante o jejum.

Entre os tecidos analisados, o músculo mandibular parece ser metabolicamente mais afetado pelos 15 dias de jejum, enquanto, nesse mesmo período de jejum, o hepatopâncreas não apresentou alterações marcantes nas vias metabólicas para a manutenção da homeostase.

A realimentação por 72 h com a dieta HC ajustou o metabolismo dos aminoácidos para a recuperação das reservas energéticas reduzidas no período de jejum. A menor oxidação da ^{14}C -glicina observada nos demais períodos de realimentação, sugerem a oxidação predominante dos aminoácidos de cadeia ramificada pelo tecido muscular.

Após a realimentação por 72 h com a dieta HP, a síntese de lipídios parece ser a principal via metabólica para a cadeia de carbono da ^{14}C -glicina no músculo mandibular. Contudo, após a realimentação por 96 e 120 h com a dieta HP, talvez a síntese

de lipídios e de glicose constituam as vias metabólicas predominantes para os aminoácidos nesse tecido.

A realimentação por 72 h com a dieta HC constituiu o período de tempo necessário para recuperação total do conteúdo de glicogênio no hepatopâncreas. Nesse período, a ^{14}C -glicina parece ser um importante substrato para a síntese de lipídios nesse tecido. Embora o aumento significativo na síntese de proteínas a partir de ^{14}C -leucina, constatado a partir das 72 h de realimentação com a dieta HC, também indique uma via metabólica para os aminoácidos nesse tecido. Após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HC, parece que a principal via metabólica dos aminoácidos no hepatopâncreas seja a síntese de proteínas e de glicose. Não foram constatadas modificações nos níveis de atividade da $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ao longo do tratamento experimental, nesse grupo de animais, sugerindo que os processos de síntese constatadas na realimentação não requerem um aumento na atividade desta enzima.

A realimentação por 72 h com a dieta HP foram suficientes para restabelecer os conteúdos de proteínas e de glicogênio reduzidos pelo período de jejum no hepatopâncreas. Talvez, a síntese de proteínas e de lipídios constituam as principais vias metabólicas dos aminoácidos nesse tecido após esse período de realimentação. Após 96 e 120 h de realimentação com a dieta HP, a síntese de glicose torna-se, também, uma importante via metabólica para os aminoácidos.

Os resultados deste estudo demonstram importantes alterações no fluxo de carbono dos aminoácidos entre as diferentes vias metabólicas no músculo e no hepatopâncreas do caranguejo *N. granulata*. Tais mudanças constituem estratégias

utilizadas durante o jejum e a realimentação conforme a composição da dieta previamente oferecida ao caranguejo.

Investigações, *in vitro*, com substratos marcados como a ^{14}C -leucina, o ^{14}C -2-piruvato, ^{14}C -glicerol-3-fosfato e ^{14}C -triacilglicerol seriam necessárias para melhor esclarecer o envolvimento dos aminoácidos nos diversos eventos fisiológicos em resposta ao jejum e a subsequente realimentação no músculo e no hepatopâncreas do caranguejo *N. granulata* alimentado previamente com diferentes dietas. Igualmente, sobre as mesmas condições experimentais, estudos relacionados entre a atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (sensível e insensível à oubaína) e os sistemas de captação de aminoácidos, dosagem das enzimas glicerol quinase e PEPCKc são necessários para confirmar algumas hipóteses constatadas neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUGUSTO, A; GREENE, L.J; LAURE, H.J; McNAMARA, J.C. The ontogeny of isosmotic intracellular regulation in the diadromous freshwater palaemonid shrimps, *Macrobrachium amazonicum* and *M. olfersi* (decapoda). **J. Crust. Biol.**, v. 27 n.4, p. 623-634, 2007.
- AVARRE, J.C; SAULNIER, D; LABREUCHE, Y; ANSQUER, D; TIETZ, A; LUBZENS, E. Response of *Penaeus indicus* females at two different stages of ovarian development to a lethal infection with *Vibrio penaeicida*. **J. Invertbr. Pathol.**, v. 82, p. 23-33, 2003.
- BAKER, N; HUEBOTTER, R.J; SCHOTZ, M.C. Analysis of glucose-¹⁴C in tissues using thin-layer chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 10, p. 227-235, 1965.
- BARNES, H; BLACKSTOCK, J. Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 12, p. 103-118, 1993.
- BOND-BUCKUP, G; FONTOURA, N.F; MARRONI, N.P; KUCHARSKI, L.C.R. **O Caranguejo: manual para o ensino prático em zoologia**. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 1991.
- BOTTO, J.L; IRIGOYEN, H.P. Biecológia de la comunidad del cangrejal contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario, *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. **Sem. Latinoam. Ecol. Biontica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur**. UNESCO, Montevideo, Uruguay, p. 161-169, 1980.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72 p. 248-254, 1976.
- BROMBERG, E. 1992. **Dinâmica osmo e ionorregulatória de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) submetido ao estresse hipo e hiperosmótico no inverno e no verão**. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) – Instituto de Biociências, Fundação Universidade do Rio Grande. Rio Grande, 1992.
- CAHILL, G.F. Starvation in man. **Clin. Endocrinol. Metabol.**, v. 5, p. 397-415, 1976.
- CALDER, P; GEDDES, R. Heterogeneity of glycogen synthesis upon refeeding following starvation. **Int. J. Biochem.**, v. 24, n. 1, p. 71-77, 1992.
- CASTELLINI, M.A; REA, L.D. The biochemistry of natural fasting at its limits. **Experimentia**, v. 48, p. 575-582, 1992.
- CHAN, L.P; SWAMINATHAN, R. Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination. **Clin. Chem.**, v. 32, n. 10, 1986.
- CHANG, E; O'CONNORS, J.D. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: BLISS, D.E. **The Biology of Crustacea**. Academic Press, New York, p. 263-289, 1983.
- CHITTÓ, A.L.F. 2005. 118f. **Estudo do metabolismo de carboidratos e de lipídios em tecidos de caranguejos *Chasmagnathus granulatus* submetidos ao estresse osmótico: inverno e verão**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- CHITTÓ, A.L.F. 90f. **Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico e hiperosmótico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas:Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

- CHITTÓ, A.L.F; SCHEIN, V; ETGES, R. KUCHARSKI, L.C; DA SILVA, R.S.M. Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. **Invertebrate Biology.**, v. 128 n.3, p. 261–268. 2009.
- CHRISTENSEN, H.N; OXENDER, D.L; LIANG, M; VATZ, K.A. Use of N-methylation of direct route of mediated transport of amino acids. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 3609-3616, 1965.
- COLLEEN, N; JAEYEON, K; KALHAN, S.C; HANSON, R.W. Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. **Trends. Endocrin. Met.**, v. 19, n. 10, p.356-361, 2008.
- CORSSMIT, E.P.M.; ROMIJN, J.A.; SAWERWEIN, H.P. Regulation of glucose production with special attention to non-classical regulatory mechanisms: a review. **Metab. Clin. Exp.**, v. 50, p. 742-755, 2001.
- CUESTA, J.A; DIESEL, R; SCHUBART, C.D. Re-examination of zoeal morphology of *Chasmagnathus granulatus*, *Cyclograpsus lavauxi*, *Hemigrapsus sexdentatus*, and *H. crenulatus* confirms consistent chaetotaxy in the Varunidae (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v. 74, n. 9, p. 895-912, 2001.
- D'INCAO, F; RUFFINO, M.L; SILVA, K.G. Notas preliminares sobre a ecologia de *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). **Resumos XV Congresso Brasileiro de Zoologia**, Curitiba, 1988.
- D'INCAO, F; RUFFINO, M.L; SILVA, K.G; BRAGA, A.C. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) na barra de Rio Grande, RS **Atlântida**, v. 12 (2), p. 85-93, 1990.
- DA SILVA, R.S.M.; KUCHARSKI, L.C.R. Effect of hyposmotic stress on the carbohydrate metabolism of crabs maintained on high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 101A, n. 3, p. 631-634, 1992.
- DA SILVA, R.S.M; MIGLIORINI, R.H. Effects of starvation and refeeding on energy-linked metabolic processes in the turtle (*Phrynops hilarii*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 96A, n. 3, p. 415-419, 1990.
- DE FEO, P; DI LORETO, C; LUCIDI, P; MURDOLO, G; PARLANTI, N; DE CICCO, A; PICCIONI, F; SANTEUSANIO, F. Metabolic response to exercise. **J. Endocrinol. Investig.**, v. 26, p. 851-854, 2003.
- DE OLIVEIRA, K.; ROTTA, L.N.; VALLE, S.C.; PILGER, D.A.; NOGUEIRA, C.W.; FEOLI, A.M.; BERNARD, E.A.; SOUZA, D.O.; PERRY, M.L.S. Ontogenetic study of the effects of energetic nutrients on amino acid metabolism of rat cerebral cortex. **Neurochem Res.**, v. 27, p. 513-518, 2002.
- DEBONS, A.F.; PITTMAN, J.A. Stimulation of alpha aminoisobutyric amino-acid ¹⁴C uptake in thyroid slices by thyrotropin. **Endocrinology**, v. 70, P. 937, 1962.
- DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4 ed. Tradução de Yara M. Michelacci. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1998.
- DING, S; WANG, F; SUN, H; GUO, B; DONG, S. Effects of Salinity Fluctuation Frequency on the Osmolarity, Na⁺-K⁺-ATPase Activity and HSP70 Expression in Juvenile Chinese Shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Oceanic Coastal Sea Res.**, v. 8 (1) p.71-76, 2009.
- DRACH, F; TCHERNIGOVTZEFF, C. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. **Vie Milieu.**, v.161, p. 595-607, 1967.
- ENES, P; PANSERAT, S; KAUSHIK, S; OLIVA-TELES, A. Dietary Carbohydrate Utilization by European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax L.*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata L.*) Juveniles. **Rev. Fish. Sci.**, v. 19, n. 3, p. 201-215, 2011.

- ERCHAO, L; ARENA, L; LIZAMA, G; GAXIOLA, G; CUZON, G; ROSAS, C; C LIQIAO; VAN WORMHOUDT, A. Glutamate dehydrogenase and Na⁺-K⁺ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. **Chin. J.Ocean. Limn.**, v. 29, n. 2, p. 343-349,2011.
- ESMANN, M. ATPpase and Phosphatase Activity of Na⁺, K⁺- ATPase: Molar and Specific activity, Protein Determination. **Meth. Enzimol.**, v. 156, p. 105-115, 1988.
- FOLCH, J; LEES, M; STANLEY, H.S. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 226, p.497-503, 1957.
- GARCIA, F; GONZALEZ-BARO, M; POLLERO, A. Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borelli*. **Lipids**, v. 37, n. 6, p. 581-585, 2002.
- GEARY, N; LANGHANS, W; SCHARRER, E. Metabolic concomitants of glucagon-induced suppression os feeding in the rat. **Am. J. Physiol.**, v. 241, n. 10, p. R330-335, 1981.
- GERING, F.S; DE OLIVEIRA, L.F.F; DUTRA, B.K, OLIVEIRA, G.T. Biochemical composition, lipoperoxidation, Na⁺/K⁺ATPase activity and reproduction of *Hyalella castroi* (Amphipoda, Dogielinotidae) fed with different diets. **J. Exp. Zoology.**, v. 311A, n. 6, p. 408-421, 2009.
- GILLES, R. Compensatory organic osmolytes in high osmolarity and dehydration stresses: history and perspectives. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 117A, p. 279-290, 1997.
- GILLES, R. Osmoregulatory process in mollucs and crustacean from media with fluctuating salinity regime. **Bol. Fisiol. Animal USP**, v. 6, p. 1-36, 1982.
- 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. Glyceroneogenesis revisited. **Biochimie.**, v. 85, p. 1199-1205, 2003.
- HARDY, D; DUTIL, J; GODBOUT, G; MUNRO, J. Survival and condition of hard shell male adult snow crabs (*Chionoecetes opilio*) during fasting at different temperatures. **Aquaculture**, v. 189 p.259-275. 2000.
- HARTNOLL, R.G. Evolution, systematics and geographical distribution. In: BURGGREN, W.; MCMOHAN, B. **Biology of Land Crabs**. New York: Cambridge University Press, 1988. p. 6-54.
- HERREID, C.F; FULL, R.J. Energetics and locomotion. In: MACMAHON, B. **Biology of Land Crabs**. Cambridge University Press, Cambridge, 1988. p. 337-377.
- HERVANT, F. The activities of enzymes associated with the intermediary and energy metabolism in hipogean and epigean crustaceans. **C. R. Acad. Sci. Paris (Série III)** v. 319, p. 1071-1077, 1996.
- HERVANT, F; MATHIEU, J; BARRE, H. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding. **J. Exp. Biology.**, v. 202, p. 3587-3595, 1999.
- HERVANT, F; MATHIEU, J; BARRE, H; SIMON, K; PINON, C. Comparative study on the behavioral, ventilatory and respiratory responses of hypogean and epigean crustaceans to long-term starvation and subsequent feeding. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 118A, p. 1277-1283, 1997.
- HERVANT, F; RENAULT, D. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. **J. Exp. Biol.**, v. 205, p. 2079-2087, 2002.

- HILL, A.D; TAYLOR, A.C; STRANG, R.H.C. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* during environmental anoxia and subsequent recovery. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 150, p. 31-50, 1991.
- HOCHACHKA, P.W; SOMERO, G.N; SCHNEIDER, D.E; FREED, J.M. The organization and control of metabolism in the crustacean gill. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 33, p. 529-548, 1970.
- HUGGINS, A.K; MUNDAY, K.A. Crustacean metabolism. **Adv. Comp. Physiol. Biochem.**, v. 3, p. 271-376, 1968.
- JOHNSTON, M.A; DAVIES, P.S. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 41B, p. 433-443, 1973.
- KANG, B.K; SPAZIANI, E. Uptake of high-density lipoprotein by Y-organs of the crab *Cancer antennarius*: III. Evidence for adsorptive endocytosis and the absence of lysosomal processing. **J. Exp. Zool.**, v. 273, p. 425-433, 1995.
- KOMATSU, M; ANDO, S. Isolation of crustacean egg yolk lipoproteins by differential density gradient ultracentrifugation. **Comp Biochem Physiol.**, v.103 B, p363-368, 1992.
- KRAUS-FRIEDMANN, N.K. Hormonal regulation of gluconeogenesis. **Physiological Reviews**, v. 64, n. 1, p. 170-255, 1984.
- KUCHARSKI, L.C.R. 1997. **Insulina: presença de receptores e efeito biológico em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata***. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas:Fisiologia) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- KUCHARSKI, L.C.R; DA SILVA, R.S.M. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp Biochem Physiol.**, v. 99A, p. 215-218, 1991a.
- KUCHARSKI, L.C.R; DA SILVA, R.S.M. Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 100A (3), p. 599-602, 1991b.
- LALLIER, F.H.; WALSH, P.J. Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Bul. Marine. Science**, v. 48, n. 3, p. 665-669, 1991.
- LALLIER, F.H; WALSH, P.J. Metabolism of isolated hepatopancreas cells from the blue-crab (*Callinectes sapidus*) under simulated postexercise and hypoxic conditions. **Physiol. Zool.**, v. 65, p. 712-723, 1992.
- LANG, F; BUSCH, G.L; RITTER, M; VOLKL, H; WALDEGGER, S; GULBINS, E; HAUSSINGER, D. Functional Significance of Cell Volume Regulatory Mechanisms. **Physiol. Ver.**, v. 78, p. 247-306. 1998.
- LUQUET, C.M; ROSA, G.A; FERRARI, C.C; GENOVESE, G; PELLERANO, G.N. Gill morphology of the intertidal estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) (Decapoda, Grapsidae) in relation to habitat and respiratory habits. **Crustaceana**, v. 73, p. 53-67, 2000.
- MACHADO, C.R; GAROFALO, M.A.R; ROSELINO, J.E.S; KETTELHUT, I.C; MIGLIORINI, R.H. Effects of starvation, refeeding, and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 71, p. 429-437, 1988.
- MACIEL, J.E; VALLE, S.C; KUCHARSKI, L.C; DA SILVA, R.S.M. Lactate metabolism in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 151A, p. 61-65, 2008.

- MAÑE-GARZON, F; DEI-CAS, E; SPECTOR, B.H; LEYMONTE, J. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. In: Osmoregulación frente a cambios de la salinidad. **Physis.**, Buenos Aires, v. 33A, p.163-171, 1974.
- MANTEL, L.H; FARMER, L.L. Osmotic and ionic regulation. In: BLISS, E.; MANTEL, L.H. **The biology of crustacean**. London: Academic Press. v. 5, p. 53-161, 1983.
- MARQUEZE, A.; KUCHARSKI, L.C.; DA SILVA, R.S.M. 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.**, v. 332, p.198-205, 2006.
- MARQUEZE, A; RIBARCKI, F; KIRST, I; KUCHARSKI, L.C; DA SILVA, R.S.M. Glucose metabolism in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata* maintained on carbohydrate-rich or high-protein diets: Anoxia and recovery. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 404, p. 40-46, 2011.
- MARTINS, T.L; CHITTÓ, A.L.F; ROSSETTI, C.L; BRONDANI, C.K; KUCHARSKI, L.C; DA SILVA, R.S.M. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. **Comp Biochem Physiol.**, v. 158A, p. 400-405, 2011.
- MAYRAND, E; DUTIL, J.D; GUDERLEY, H. Changes in muscle of postmoult snow crabs *Chionoecetes opilio* (*O. Fabricius*) fed different rations. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v 243, p. 95–113, 2000.
- MAYRAND, E; GUDERLEY, H; DUTIL, J.D. Biochemical indicators of muscle growth in the snow crab *Chionoecetes opilio* (*O. Fabricius*). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 255 p. 37–49, 2000.
- McCUE, M.D. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 156A, p. 1–18, 2010.
- McNAMARA, J.C; ROSA, J.C; GREENE, L.J; AUGUSTO, A. Free amino acid pools as effectors of osmotic adjustment in different tissues of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Crustacea, Decapoda) during long-term salinity acclimation. **Mar. Freshw. Behav. Physiol.**, v. 37, p. 193–208, 2004.
- MIGLIORINI, R.H; LINDEN, C; MOURA, J.L; VEIGA, J.A.S. Gluconeogenesis in a carnivorous bird (black vulture). **Am J. Physiol.** v. 225, p. 1389-1392, 1973.
- MITHIEUX, G.; BADI, 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.
- MOON, T.W. Adaptation, constraint, and the function of the glyconeogenic pathway. **Can. J. Zool.**, v. 66, p. 1059-1068, 1988.
- MORRIS, S; AIRRIESS, C.N. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. **S. Afr. J. Zool.** v. 33, p. 87-106, 1998.
- MURIANA, F.J.G; RUIZ-GUTIERREZ, V; GALLARDO-GUERRERO, M.L; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. A study of the lipids and carotenoprotein in the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Biochem.**, v. 114, p. 223–229, 1993.
- NERY, L.E.M; SANTOS, E.A. Carbohydrate metabolism during osmorregulation in *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea, Decapoda). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 106B, p. 747-753, 1993.
- NEWGARD, C.B; MOORE, S.V; FOSTER, D.W; McGARRY, J.D. Efficient hepatic glycogen synthesis in refeeding rats requires continued carbon flow through the gluconeogenic pathway. **J. Biol. Chemistry**, v. 259, n. 11, p. 6958-6963, 1984.

- NEWSHOLME, E.A; LEECH, A.R. **Biochemistry for the medical sciences**. New York: John Wiley & Sons, 1983.
- NILSSON, G.E. Surviving anoxia with the brain turned on. **News Physiol. Sci.**, v. 16, p. 218–221, 2001.
- O'CONNOR, J.D; GILBERT, L.I. Aspects of lipid metabolism in crustaceans. **Am. Zool.**, v. 8, p. 529–539, 1968.
- ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Interamericana, 1985.
- OLIVEIRA, G.T.; DA SILVA, R.S.M. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in crabs *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 127B, p. 375-381. 2000.
- 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.**, v. 118A, n. 4, p. 1429-1435, 1997.
- OLIVEIRA, G.T; ROSSI, I.C; KUCHARSKI, L.C; DA SILVA, R.S.M. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.137A, p. 383-390, 2004.
- OLIVEIRA, G.T; FERNANDES, F.A; BOND-BUCKUP, G; BUENO, A.A; DA SILVA, R.S.M. Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). **Mem Mus Victoria**, v. 60, p. 59–62. 2003.
- PANSERAT, S.; PLAGNES-JUAN, E.; BREQUE, J.; KAUSHIK, S. Hepatic phosphoenolpyruvate carboxikinase gene expression is not repressed by dietary carbohydrates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Exp. Biol.**, v. 204, n. 2, p. 359-365, 2001.
- PANSERAT, S; PLAGNES-JUAN, E; KAUSHIK, S. Gluconeogenic enzyme gene expression is decreased by dietary carbohydrates in common carp (*Cyprinus carpio*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1579, p. 35-42, 2002.
- PASCUAL, C; SÁNCHEZ, A; ZENTENO, E; CUZON, G; GABRIELA, G; BRITO, R; GELABERT, R; HIDALGO, E; ROSAS, C. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.**, v. 251, 416-429, 2006.
- PELLEGRINO, R; KUCHARSKI, L.C; DA SILVA, R.S.M. Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulata* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 358, p. 144-150, 2008.
- RICHARDSON, N.A; ANDRESON, A.J; SARA, V.R. The effects of insulin/IGF-1 on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). **Gen Comp Endocr.**, v. 105, p. 287-293, 1997.
- ROBERTSON, J.D; COWEY, C.B; LEAF, G. The free amino acids in muscle as three marine invertebrates *Nephrops norvegicus* (L) and *Eledone cirrhosa* (Lamarck). **Comp. Biochem. physiol.**, v. 101A, n. 3, p. 545-548, 1992.
- ROSAS, C; CUZON, G; GAXIOLA, G; LEPRIOL, Y; PASCUAL, C; ROSSIGNYOL, J; CONTRERAS, F; SANCHEZ, A; VAN WORMHOUDT, A. Metabolism and growth of juveniles of *Litopenaeus vannamei*: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 259, p. 1-22, 2001.
- SAKAI, K; TÜRKAY, M; YANG, S.L. Revision of the *Helice/Chasmagnathus complex* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). **Abh Senckenberg Naturforsch Ges.** v. 565, p. 1–76, 2006.

- SÁNCHEZ-PAZ, A; GARCIA-CARRENO, F; HERNANDEZ-LOPEZ, J; MUHLIA-ALMAZAN, A; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **J Exp Mar Bio Ecol.**, v. 340 n. 2 p. 184-193, 2007.
- SANTOS, E.A; BALDISSEROTO, B; BIANCHINI, A; COLARES, E.P; NERY, L.E.M; MANZONI, G.C. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 88A, n. 1, p. 21-25, 1987.
- SANTOS, E.A; NERY, L.E.M. Blood glucose regulation in a estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1981) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 87A, p. 1033-1035, 1987.
- SARTORI, D.R.S.; GAROFALO, M.A.R.; ROSELINO, J.E.S.; KETTELHUT, I.C.; MIGLIORINI, R.H. Gluconeogenesis and P-enolpyruvate carboxykinase in liver and kidney of long-term fasted quails. **J. Comp. Physiol.**, v. 170B, p. 372-377, 2000.
- SCHEIN, V. 1999. 114f. **Efeitos da adaptação prévia a dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao estresse hiperosmótico do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.
- SCHEIN, V. 2003. 124f. **Efeitos do estresse osmótico sobre a via gliconeogênica no tecido muscular e sobre a captação de aminoácidos no hepatopâncreas e músculo do caranguejo *Chasmagnathus granulata*.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- SCHEIN, V; CHITTÓ, A.L.F; ETGES, R; KUCHARSKI, L.C., WORMHOUDT, A.V; DA SILVA, R.S.M. Effect of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140B, p. 561-567. 2005b.
- SCHEIN, V; CHITTÓ, A.L.F; ETGES, R; KUCHARSKI, L.C; WORMHOUDT, A.V; DA SILVA, R.S.M. Effects of hypo- or Hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 316, p. 203-212, 2005a.
- SCHEIN, V; WACHÉ, Y; ETGES, R; KUCHARSKI, L.C, WORMHOUDT, A.V; DA SILVA, R.M.S. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. **FEBS Letters**, v. 561, p. 202-206, 2004.
- SCHIRF, V.R; TURNER, L.S; HANAPEL, C; DE LA CRUZ, P; DEHN, P.F. Nutritional status and energy metabolism of crayfish (*Procambarus clarkii*, *Girardi*) muscle and hepatopancreas. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 88 A, p. 383-386, 1987.
- SHULMAN, G.I; LANDAU, B.R. Pathways of glycogen repletion. **Physiol. Reviews**, v. 72, n. 4. p. 1019-1035, 1992.
- SILVA-CASTIGLIONI, D; OLIVEIRA, G.T, BUCKUP, L. Metabolic responses in two species of crayfish (*Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis*) to post-hypoxia recovery. **Comp Biochem Physiol.**, v. 159A p. 332-338, 2011.
- SPIVAK, E.D. The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. **Helgol. Mar. Res.** v. 64, p. 149-154, 2010.
- STOREY J.M; STOREY, K.B. **Oxygen limitation and metabolic rate depression.** In: K.B. Storey, Ed. *Funct. Metab. Regu. Adapt.* Wiley-Liss Hoboken, p. 594, 2004

- SUGDEN, M.C; HOLNESS, M.J; PALMER, N.T. Fuel selection and carbon flux during the starved-to-fed transition. **Biochem. J.**, v. 263, p. 313-323, 1989.
- SURHOLT, B.; NEWSHOLME, E. Maximum activities and properties of glucose-6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, v. 198. p. 621-629, 1981.
- THABREW, M.I; POAT, P.C; MUNDAY, K.A. Carbohydrate metabolism in *Carcinus maenas* gill tissue. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 40B, p. 531-541, 1971.
- TURCATO, G.S. 1990. **Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil.** Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- VALLE, S.C, EICHLER, P, MACIEL, J.E, MACHADO, G, KUCHARSKI L.C, DA SILVA R.S.M. Seasonal variation in glucose and neutral amino acid uptake in the estuarine crab *Neohelice granulata*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 153A p.252-257, 2009.
- VAN AARDT, W.J. Lactate metabolism and glucose patterns in the river crab, *Potamonautes warreni*. Calm, during anoxia and subsequent recovery. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 91A, p. 299-304, 1988.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analyt. Biochem.**, v. 11, p. 256-265, 1965.
- VINAGRE, A.S. 1992. 110f. **Efeito da adaptação prévia a uma dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao jejum do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851).** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.
- VINAGRE, A.S; AMARAL, A.P.N; RIBARCKI, F.P; SILVEIRA, E.F; PÉRICO, E. Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). **Comp Biochem Physiol.**, v. 146 A, p. 514-519, 2007.
- VINAGRE, A.S; DA SILVA, R.S.M. - Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). **Can. J. Zool.**, v. 80, p. 1413-1421, 2002.
- VINAGRE, A.S; DA SILVA, R.S.M. - Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 102A, p. 579-583, 1992.
- WALSH, P.J.; HENRY, R.P. Activities of metabolic enzymes in the deep-water crabs *Chaceon fenneri* and *C. quinquendens* and the shallow-water crab *Callinectes sapidus*. **Marine Biology**, v. 106, p. 342-346, 1990.
- WATFORD, M.; HOD, Y.; CHIAO, Y.B.; UTTER, M.F.; HANSON, R.W. The unique role of the kidney in gluconeogenesis in the chicken. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 10023-27, 1981.
- WÜRDIG, N.L, 1984. **Ostracodes do sistema lagunar de Tramandaí , RS, Brasil, sistemática, ecologia e subsídios à paleoecologia.** Tese (Doutorado em Paleontologia) – Curso de Pós-Graduação em Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.
- XAVIER, A.R; ROSELINO, J.E.S; RESANO, N.M.Z; GAROFALO, M.A.R; MIGLIORINI, R.H; KETTELHUT, I.C. Glyconeogenic pathway in isolated skeletal muscles of rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 80, p. 164-169, 2002.

YAO, D; MACKENZIE, B; MING, H; VAROQUI, H; ZHU, H; HEDIGER, M.A; ERICKSON, J.D. A novel system A isoform mediating Na⁺/neutral amino acid cotransport. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22790-22797, 2000.

ZAMMIT, V.A; NEWSHOLME, E.A. Properties of piruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxikinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscle of the frog and marine invertebrates. **Biochem. J.**, v. 174, p. 979-987, 1978.

ANEXOS

Effect of starvation and refeeding on amino acids metabolism in muscle of crab

Neohelice granulata previously fed protein- or carbohydrate-rich diets

Ricardo **Pellegrino**, Tiago Leal **Martins**, Charles Budaszewski **Pinto**, Vanessa **Schein**,

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

Abstract

The present study assesses the effects of starvation and refeeding on ^{14}C -MeAIB uptake, ^{14}C -total lipid, $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -glycine, ^{14}C -proteins synthesis from ^{14}C -leucine and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity in jaw muscle of *Neohelice granulata* previously maintained on a carbohydrate-rich (HC) or high-protein (HP) diet. In *N. granulata* the metabolic adjustments during the fasting and refeeding use different pathways according to the composition of the diet previously offered to the crabs. During fasting, $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -glycine, and ^{14}C -proteins from ^{14}C -leucine were reduced in HC-fed crabs. In crabs maintained on the HP or HC diet, ^{14}C -total lipids synthesis increased after 15 days of starvation. In crabs fed HP diet, ^{14}C -MeAIB uptake and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity decreased in refeeding state. In crabs refeeding HC diet, ^{14}C -MeAIB uptake and $^{14}\text{CO}_2$ production decreased during the refeeding. In contrast, the ^{14}C -proteins synthesis increased after 120h of refeeding. In both dietary groups, ^{14}C -total lipids synthesis increased during refeeding. Changes in the carbon amino acids flux between different metabolic pathways in muscle are among the strategies used by this crab to face starvation and refeeding. Protein or carbohydrate levels in the diet administered to this crab modulate the carbon flux between the different metabolic pathways.

Keywords: Muscle, diet, amino acids metabolism, fasted-refed crabs

1. Introduction

Starvation is an integral part of the natural life cycle of *N. granulata*. In the field *N. granulata*, the concentration of hemolymph glucose is increased in summer as compared with other seasons of the year (Kucharski and Da Silva, 1991b; Valle et al., 2009). In winter these animals stay in their holes for longer periods and the frequency of dietary items in the stomach is low, indicating a reduced availability of energy substrate (D'Incao et al., 1990; Turcato, 1990). Therefore, *N. granulata* mobilizes body constituents and survives natural starvation periods such as those encountered during the winter. Hepatopancreas and muscle glycogen seem to be the main energy sources in spring and summer, whereas muscle lipids are used as energy substrate in fall and winter (Kucharski and Da Silva, 1991b).

N. granulata fed either a high-protein (HP) or a high-carbohydrate (HC) diet exhibit a characteristic pattern of carbohydrate and lipid metabolism adjustment (Kucharski and Da Silva, 1991a). Moreover, the carbohydrate and lipid metabolism response to starvation and refeeding also varies according to diet composition (Pellegrino et al., 2008; Vinagre and Da Silva, 1992; 2002). In crabs previously fed HP or HC diets and then fasted for 8 weeks, muscle glycogen levels were already decreased after the first week of starvation and 60% lower at the end of the experimental period in both groups (Pellegrino et al., 2008; Vinagre and Da Silva, 1992). Crabs previously fed an HC diet and then fasted for 8 weeks showed a gradual decrease of total lipid levels in muscle, which were 54% lower at the end of the experimental period (Vinagre, 1992).

In refeeding after 21 days of food deprivation, *N. granulata* presents an adjustment in the processes of anabolic synthesis to recover the metabolic reserves that were lost during starvation (Vinagre and Da Silva, 2002). In *N. granulata* previously fed an HP diet, three weeks of starvation decreased glycogen synthesis from ^{14}C -glycine in muscle; however, after a 48-hour period of refeeding, these levels were close to those of the fed group. Yet, the rate of incorporation of ^{14}C -glucose into muscle lipid was not influenced by starvation or refeeding and a reduction in protein synthesis from ^{14}C -glycine was found in muscle of refeed crabs (Vinagre and Da Silva, 2002).

Pellegrino et al. (2008) demonstrated that 15-day starvation caused a reduction of the muscle gluconeogenic capacity from ^{14}C -lactate in *N. granulata* crabs previously maintained on an HC diet but an increase of it in crabs previously fed an HP diet. However, in both fed and refeeding states, muscle glyconeogenesis is one of the pathways

responsible for maintenance of lactate levels in crabs fed HC diet. In animals fed on the HP diet, the muscle gluconeogenesis and glyconeogenesis pathways are involved in the reduction of lactate levels during the refeeding period (Pellegrino et al., 2008).

Studies with different species of crustaceans have demonstrated a wide diversity in metabolic strategies used during starvation and refeeding (Hardy et al., 2000; Hervant et al., 1999; Mayrand et al., 2000a; b; Sánchez-Paz et al., 2007; Vinagre and Da Silva, 2002).

In the tiger prawn *Penaeus esculentus*, the muscle protein is used preferentially as source of energy after 5-15 days of starvation (Barclay et al., 1983; Dall and Smith, 1986). In *Gammarus fossarum*, a period of 7 days of refeeding led to partial restoration of the energy reserves depleted during starvation. In contrast, in the amphipods *Niphargus virei* and *Niphargus rhenorhodanensis*, energy reserves were fully restored only after 15 days of refeeding (Hervant et al., 1999). Hervant and Renault (2002) suggested a sequential energy strategy with four phases (stress, transition, adaptation and recovery) to represent the responses of subterranean crustaceans to food deprivation stress and renutrition.

In juvenile *Litopenaeus vannamei* starved for 21 days, a reduction in digestive gland glycogen and lipids was observed; however, the effect of starvation was smaller in shrimps previously fed a high (40%) protein diet (Pascual et al., 2006). According to Rosas et al. (2002), protein levels in diet modulate the use of energy in shrimp, but the pathways involved in amino acids metabolism are little known in *N. granulata*.

Thus, the aim of this study was to determine the role of diet composition in muscle patterns of adjustments of amino acids metabolism to starvation and different times of refeeding in *N. granulata* previously maintained either on a high carbohydrate or on a high protein diet.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

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

2.2. Experimental procedure

Upon arrival at the laboratory the crabs they were weighed (16-18 g) and placed (15 crabs/aquarium) in aquaria containing water with a salinity of 20‰ and kept at 25 °C under a natural light/dark cycle. The animals were divided in two groups: one to be fed a high-protein diet (HP, beef, protein 21.59%, carbohydrate 0.03%, fat 6.71%; ash 0.35%; fiber 0.31%; water content 71.01%; caloric content 146.87 cal/100 g), and the other to be fed a carbohydrate-rich diet (HC, boiled rice, carbohydrate 34.56%, protein 3.34%, fat 0.45%; ash 0.02%; fiber 0.30%; water content 61.33%; caloric content 155.65 cal/100 g). Protein and carbohydrate contents of the crab food constituents were determined by the Food Technology Institute at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Both groups were fed daily *ad libitum* (about 50 g) in the late afternoon for two weeks before being used in the experiments. There was no variation in body weight (17.5 ± 0.5 g) of the crabs in either group during the experimental period. The experiments were performed during spring and summer.

After this period of acclimation, the crabs were used in the different experimental protocols. For starvation and refeeding studies, pools of 14 animals receiving either the HC or the HP diet were kept individually in closed polyethylene cages (10×10×10 cm) inside the aquaria to avoid incidents of cannibalism and starvation for 15 days. The fasted-refed crabs were deprived of food for 15 days and then fed *ad libitum* for 72, 96 and 120 h with the same diets (50 g) administered before starvation (HP or HC). The control group was maintained with HC or HP diet *ad libitum* during the experimental period. All crabs were maintained in aquaria under the above-mentioned conditions. After these periods of food deprivation and refeeding, the same measurements carried out in the fed group (control) were performed in crabs submitted to starvation and fasting-refeeding. Before the experimental procedure, crabs were anesthetized by chilling (5 min), and the two (left and right) jaw muscles (100 mg) of individual specimens were rapidly removed and placed on a Petri dish containing cold incubation buffer adapted to *N. granulata* (SFC): 350 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 8.8mM H₃BO₃, plus 10mM HEPES and 1% PMSF, pH 7.8. There was no death or body-mass variation during the experimental periods.

2.3. ^{14}C -MeAIB uptake

The present study used the 1- ^{14}C -methyl aminoisobutyric acid (MeAIB) analog, which is taken up by cells via sodium-dependent system A. System A is adaptive, sensitive to changes in the electrogenic potential and transports the neutral amino acids (glycine, alanine, methionine, glutamine and proline) as well as methylamines (sarcosine and betaine) (Guidotti and Gazzola, 1992; Schein et al., 2005). Muscle samples (about 50mg) were incubated (Dubnoff incubator) at 25°C with constant shaking for 60 min in 500 μL of SFC pH 7.8, equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v) in the presence of 0.2 μCi of 1- ^{14}C -methyl aminoisobutyric acid (60mCi/mol, Du Pont). Following incubation, the tissue fractions were removed from the medium, rinsed twice in cold incubation buffer (without radiolabeled products), blotted on filter paper and immediately transferred to screw cap tubes containing 1 mL of distilled water, and alternately frozen and boiled three times (Schein et al., 2005). Aliquots (100 μL) of this solution and of the incubation media were used for radioactive counting in toluene-TritonX-100 (2:1, v/v) PPO-POPOP. Radioactivity was measured in a LKB-Wallac scintillation counter. The results were expressed as tissue/medium (T/M) ratio, i.e., cpm/mL of tissue fluid divided by cpm/mL of incubation medium.

2.4. Conversion of ^{14}C -glycine to ^{14}C -lipids

For determination of ^{14}C -lipids synthesis, muscle slices (about 50 mg) were incubated at 25°C with constant shaking with 500 μL of SFC pH 7.8, equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v) in the presence of 0.2 μCi of $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glycine (104 mCi/mmol Amersham, International), plus 5 mM of unlabeled glycine, for 60 min. After addition of the unlabeled substrates, the incubation medium pH was determined. Tissue reactions were stopped in an ice bath, and the tissues fractions were removed from the medium, rinsed twice in a cold incubation buffer (without radiolabeled products), and blotted on filter paper. The samples were homogenized in chloroform:methanol (2:1, v/v). Lipids were extracted according to Folch et al. (1957), dissolved in toluene-PPO and radioactivity was measured in a LKB-Wallac scintillation counter. The results were expressed as μmol of ^{14}C -glycine converted into ^{14}C -total lipids. mg^{-1} of protein. h^{-1} of incubation.

2.6. $^{14}\text{CO}_2$ production

For production of $^{14}\text{CO}_2$, the muscles samples (about 50 mg) were incubated at 25 °C with constant shaking in sealed flasks with 500 μL of SFC pH 7.8, equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v) in the presence of 0.2 μCi of $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -glycine (104 mCi/mmol, Amersham International) plus 5 mM of unlabeled glycine, for 60 min. Small strips of 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 200 μL 50% TCA into the SFC and 200 μL of 1 M Hyamine[®] hydroxide (ammonium, benzyldimethyl (2-(2-(4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl) tolyloxy)ethoxy)ethyl)-chloride) solution in methanol injected into the wells, through the rubber stopper, to trap $^{14}\text{CO}_2$. The sealed flasks remained at room temperature overnight, after which the wells with the paper were placed in vials containing toluene-triton (2:1, v/v) PPO-POPOP and the radioactivity was measured in a LKB-Wallac scintillation counter. The values of $^{14}\text{CO}_2$ production were expressed in μmol of ^{14}C -glycine converted to $^{14}\text{CO}_2\cdot\text{g}^{-1}$ of tissue. $\cdot\text{h}^{-1}$ of incubation.

2.7. Conversion of ^{14}C -leucine to ^{14}C -protein

For determination of ^{14}C -proteins synthesis, fractions of the muscle (about 50 mg) were incubated at 25°C with constant shaking in 500 μL of SFC pH 7.8, equilibrated with $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5, v/v) in the presence of 0.2 μCi of $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -leucine (315 mCi/mmol Amersham, International), plus 5 mM of unlabelled leucine, for 180 min. Previous trials showed that incorporation rates remained linear over this incubation period (Vinagre, 1999). Tissue reactions were stopped in an ice bath, and the tissues were rinsed threefold in cold SFC (without radiolabeled product), dried on filter paper, and immediately transferred to screw cap tubes containing 500 μL of distilled water and were homogenized. Samples (50 μL) were removed for determination of total proteins. Incorporation of $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ -Leucine into ^{14}C -protein in muscle was determined according to Richardson et al. (1997). In the presence of scintillation liquid (toluene-triton (2:1, v/v) PPO-POPOP), radioactivity was measured in a LKB-Wallac scintillation counter, and the results were expressed as μmol of ^{14}C -leucine converted into ^{14}C -protein. mg^{-1} of protein. h^{-1} of incubation.

2.8. Enzyme assay

For determination of the Na⁺-K⁺-ATPase (EC 3.6.1.3) activity, the membrane was extracted from tissue according to Barnes and Blackstock (1993). The tissue was homogenized (10% W/V) in cold Tris buffer (40 mM) and phenylmethylsulfonyl fluoride (1mM; Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 10.000xg at 4°C, and the supernatant was collected and centrifuged at 40.000g (4°C). The pellet was resuspended in the same buffer and centrifuged again at 40.000xg (4°C). This last supernatant was then used as the source of Na⁺-K⁺-ATPase. A sample was removed for measure of proteins. Na⁺-K⁺-ATPase activity was determined according to the method described by Esmann (1988). Incubation medium A contained ATP (5 mM, Sigma), NaCl (60 mM), KCl (10 mM) and MgCl₂ (40 mM), pH 7.4. In incubation medium B, KCl was replaced by ouabain (1mM, Sigma). Aliquots of homogenate were incubated at 30°C in medium A or B, for 30 min. The enzyme reaction was stopped by addition of 10% trichloroacetic acid. The inorganic phosphate (Pi) released was determined using the method of Chan and Swaminathan (1986) and Na⁺-K⁺-ATPase activity was calculated as difference between medium A and B in Pi content in μmol per min. Results were expressed in μmol of the Pi.mg⁻¹protein.min⁻¹.

2.9. Chemical analyses

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), using bovine albumin as standard.

3. Statistical analyses

Results are expressed as mean ± S.D. (standard deviation). Data from the experiments were used to compare the effects of the HP and HC diets by two-way analysis of variance (ANOVA). To compare the different experimental conditions to which the two groups were submitted, we used one-way ANOVA followed by Student-Neumann-Keuls (SNK) comparison test at significance levels of P<0.05 and P<0.01. All tests were performed with statistical software SigmaStat 3.1.

4. Results

In jaw muscle of crabs previously fed a HC or HP diet, ^{14}C -MeAIB uptake values were not affected by 15-day starvation (Figure 1). However, after 72 h of refeeding, in crabs previously fed the HC diet, ^{14}C -MeAIB uptake values decreased by 58% ($p < 0.05$) as compared to control and starvation groups, and remained low until the end of the experimental period. In the HP group, a decrease of 74% ($p < 0.05$) in ^{14}C -MeAIB uptake values was observed only at 120h of refeeding. No significant difference in ^{14}C -MeAIB uptake was observed in muscle of fed crabs under the two different diets (Figure 1).

In the control group, diet composition did not affect the muscle ability to synthesize ^{14}C -lipids from ^{14}C -glycine. However, after starvation the ability to form ^{14}C -lipids from ^{14}C -glycine increased by 4.7-fold in the HC group and 14-fold in the HP group as compared to their respective control groups. In both HP and HC diets, incorporation of ^{14}C -glycine in muscle total lipids remained significantly ($p < 0.05$) high during the refeeding period of 72 to 96 h. After 120 h of refeeding, ^{14}C -lipid values in muscle increased by 17.4-fold and 18.5-fold ($p < 0.05$) as compared to the values of the groups fed the HC and HP diets, respectively (Figure 2).

In muscle from HC control group, $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -glycine was 1.7 times as high ($p < 0.05$) as the one detected for HP group crabs. In crabs previously fed the HC diet, $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -glycine in muscle decreased by 56% ($p < 0.05$) after fasting, returning to the levels of the fed group at 72 h of refeeding. However, in the 96-120 h refeeding period, $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -glycine was significantly decreased as compared to control and 72 h refeeding groups. In crabs previously fed the HP diet, fasting and refeeding did not affect significantly the levels of $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -glycine (Figure 3).

In crabs previously fed the HC diet, the muscle ability to synthesize ^{14}C -proteins from ^{14}C -leucine was 2.3-fold greater ($p < 0.05$) than in the HP diet group. In animals submitted to the HP diet, fasting and refeeding did not significantly alter ^{14}C -proteins synthesis from ^{14}C -glycine in jaw muscle. However, in crabs previously fed the HC diet, fasting and 72 h and 96 h of refeeding markedly decreased ^{14}C -proteins synthesis from ^{14}C -glycine in jaw muscle. After 120 h of refeeding, ^{14}C -proteins synthesis values in the HC group were significantly increased as compared to fasting and 72 h and 96 h refeeding groups (Figure 4).

There were no significant differences in total protein concentrations in muscle of crabs previously fed the HC or the HP diet. In both groups, the values of total proteins in muscle were not affected significantly by fasting and by the different refeeding times (Table 1).

$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity in muscle of crabs maintained on the HC and HP diets was compared and found to be 2.6-fold higher ($p < 0.05$) in the HP group. In the HC group, fasting and refeeding did not affect $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity significantly. In the HP group, 15-day fasting did not alter $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity significantly. However, refeeding for 96 and 120 h decreased $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity by 56% and 51% ($p < 0.05$), respectively, as compared to the fed group (Figure 5).

5. Discussion

Previous studies in *N. granulata* have demonstrated the influence of diet composition on the physiological events involved in homeostasis during food deprivation (Oliveira et al., 2004; Pellegrino et al., 2008; Vinagre and Da Silva, 1992). This study shows that dietary protein and carbohydrate previously provided to crabs affects the synthesis of endogenous physiological fuels in muscle in the fed state, as well as the tissue flow of carbon from energy-linked substrates in starvation and refeeding status.

No significant difference was found in muscle protein levels and ^{14}C -MeAIB uptake between crabs fed HP and HC diets, suggesting that the muscles of HC- and HP-fed crabs were in the same protein condition. The HP-fed control group has a lower capacity to incorporate ^{14}C -leucine into proteins. In vertebrates muscle, the branched amino acid leucine is oxidized to CO_2 (De Feo et al., 2003), and its oxidation increases when the concentrations of glycogen and/or ATP in muscle are reduced. In muscle from HP-fed crabs, Marqueze et al. (2006) found lower ATP and glycogen levels than in the HC-fed group, suggesting that in HP group ^{14}C -leucine is diverted from protein synthesis pathway to give rise to acetyl-CoA for ATP formation. Elucidation of this point requires further studies with measurements of ^{14}C -leucine incorporation into $^{14}\text{CO}_2$ in muscle from HP- and HC-fed crabs. Moreover, in HP-fed crabs the formation of $^{14}\text{CO}_2$ from ^{14}C -glycine in fed group (control) was lower than that found in HC group. This result may be explained by the higher $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -lactate found in muscle from HP-fed crabs, since in control *N. granulata* the lactate:glucose rate in hemolymph of HP-fed crabs is 1.35 (Marqueze et al., 2006; Pellegrino et al., 2008). Another hypothesis is the preferential use

of branched chain amino acids as energy source in muscle of HP-fed crabs, as demonstrated in vertebrates (De Feo et al., 2003).

It is noteworthy that Na^+ , K^+ ATPase activity is very low in the group fed the HC diet. Also, in male crustacean *Hyalella castroi* fed on high carbohydrate diet for 7-14 days, Na^+ , K^+ ATPase activity is lower as compared to high-protein fed crabs (Gering et al., 2009). The authors suggested that the lower Na^+ , K^+ ATPase activity in crabs fed with high carbohydrate diet can be explained by the high levels of lipoperoxidation, leading to alterations in membrane structure and function (Gering et al., 2009). In this study, the activity of Na^+ , K^+ ATPase was assayed by the method of Chan and Swaminathan (1986), that is sensible to ouabain. Since we did not measured the Na^+ , K^+ -ATPase activity insensitive to ouabain in HC fed crabs, we cannot rule out that this can be high. The hypothesis of the presence of a Na^+ , K^+ ATPase ouabain insensitive to the jaw muscle and hepatopancreas was suggested by Schein et al. (2005). Recently, Pinoni and Mañanes (2009) found in *N. granulata* muscle the presence of the enzyme Na^+ , K^+ -ATPase ouabain insensitive and sensitive.

In *Litopenaeus vannamei*, no significant differences were observed in Na^+ , K^+ -ATPase mRNA level after 20 days on diets with different protein contents (25% to 50%) (Erchao et al., 2011).

The semi-terrestrial crab *N. granulata* is tolerant to starvation, since this status is an integral part of its life cycle, when in winter it remains in holes for longer periods and food is scarce (Kucharski and Da Silva, 1991b; Turcato, 1990). Nevertheless, *N. granulata* maintains physiological homeostasis even after 8 weeks of food deprivation (Vinagre and Da Silva, 1992). Successful starvation strategies must enable an animal to mobilize endogenous physiological fuels such as proteins, lipids, and carbohydrates to meet the energetic demands required to carry out the basic processes of life (McCue, 2010).

The Na^+ , K^+ ATPase activity does not show significant change after food deprivation in muscle from crabs fed on either diet, suggesting that 15 days of starvation does not induce a metabolic depression in these animals. In contrast, in other crustaceans, such as *Paralomis granulosa* and *Lithodes santolla*, starvation increases oxygen consumption (Comoglio et al., 2005; 2008).

In crabs previously fed the HC diet and fasted for 15 days, the formation of $^{14}\text{CO}_2$ from ^{14}C -glycine in jaw muscle was lower than in the fed group. After 15 days of starvation, the glycogen concentration in jaw muscle and hemolymphatic glucose of *N.*

granulata fed-HC diet decrease significantly (Pellegrino et al., 2008). Thus, the decrease of ^{14}C -glycine oxidation in muscle after 15 days of starvation would be a consequence of the utilization of glucose as source of energy. Moreover, in HC-fed crabs, the rate of conversion of ^{14}C -leucine to ^{14}C -protein decreased. Decreasing the activity of energy-consuming processes, such as protein synthesis, could be a strategy to prioritize the expenditure of ATP in metabolic pathways (gluconeogenesis and glyceroneogenesis) that are important for the maintenance of homeostasis during fasting. However, the protein concentration in muscle was maintained without significantly changes after 15 days of starvation. In contrast, other crustaceans, such as *Paralomis granulosa* and *Lithodes santolla*, use protein reserves as a source of energy during the early stages of starvation (Comoglio et al., 2005; 2008).

In HP-fed crabs, 15 days of food deprivation did not change significantly CO_2 formation from amino acids. In this experimental group the maintenance of amino acids oxidation during the fasting period would be a strategy to obtain energy, because Pellegrino et al. (2008) did not find significant change in muscle glycogen concentration after 15 days of fasting in HP-fed crabs. Also, in crabs previously fed an HP diet, the incorporation of ^{14}C from leucine into proteins did not change significantly after 15 days of starvation. Thus, the maintenance of protein synthesis and amino acids uptake capacities in muscle of HP-fed crabs during starvation keeps the protein synthesis/mobilization cycle important for homeostasis during starvation. In this group, the protein content in muscle is maintained after 15-day starvation. In *L. vannamei* a marked decrease in hemolymph protein content after 15-day starvation was observed in shrimp previously fed 5% and 40% protein diets (Pascual et al., 2006).

An increase in lipid synthesis from ^{14}C -glycine was observed in muscle of crabs fed on either diet. It is noteworthy that ^{14}C -MeAIB uptake is maintained with little variation during the starvation period in muscle of crabs fed on either diet, suggesting that the present results are not a consequence of the influx changes of amino acids to the muscle cells. A likelier explanation is that starvation elicits an enhancement of the glyceroneogenic activity, increasing incorporation of ^{14}C from glycine in triacylglycerol. Starvation for 15 days increases total lipid values in hemolymph of *N. granulata* by approximately 100% in crabs fed the HP diet and 40% in animals previously maintained on the HC diet (Vinagre and Da Silva, 1992).

The fact that muscle PEPCK activity in crabs previously fed either diet increased after 15 days of starvation (unpublished data) suggests that the muscle glyceroneogenic pathway could maintain the cycle triacylglycerol/fatty acids during starvation. *N. granulata* muscle lipids are important energy sources in winter periods, when food is scarce (Kucharski and Da Silva, 1991b), after long periods of food deprivation (8 weeks) (Vinagre and Da Silva, 1992), and during osmoregulatory effort (Bianchini et al., 2008; Chittó, 2009; Luvizzotto-Santos et al., 2003; Martins et al., 2011).

The activation of endergonic synthetic processes is a characteristic of refeeding, and in some animals species, a long period is necessary to attain the metabolic pattern of the fed state. Also, the metabolic adjustment that occurs in refeeding differs from those that occur in starvation or fasting and in the fed state (Hervant et al., 1999).

In crabs refed with the HC diet no significant alteration in the Na⁺, K⁺-ATPase activity was observed in relation to starvation and fed states, showing that the activation of synthesis processes does not markedly alter the metabolic rate in muscle of HC-fed crabs.

Fasting (15 days) followed by refeeding with an HC diet for 120 h increased significantly the hemolymphatic glucose concentration, glycogen levels, gluconeogenic and glyconeogenesis activities from lactate in *N. granulata* muscle (Pellegrino et al., 2008). These findings maybe explain, in part, the reduction in ¹⁴C-MeAIB uptake found in muscle from HC refeeding crabs. During 120 h of refeeding with HC diet the muscle restores the carbohydrates reserves, decreased during starvation (Pellegrino et al., 2008). These data corroborate the low capacities for protein synthesis and ¹⁴C-glycine oxidation found in this study during the refeeding period in HC-fed crabs. The restoration of glycogen to fed levels in muscle is important, because glucose is a source of energy for this tissue, particularly during refeeding, when crabs increase their locomotor activity.

On the other hand, lipid synthesis from ¹⁴C-glycine in muscle increased gradually during the refeeding period with the HC diet. The carbohydrate metabolic adjustments in muscle (described above) during refeeding with an HC diet (Pellegrino et al., 2008) could favor lipogenesis from amino acids. This hypothesis is corroborated by the increase in gluconeogenesis and glyconeogenesis activities from lactate in muscle during refeeding (72 to 120h) with HC diet (Pellegrino et al., 2008).

The pattern of the adjustments of amino acids metabolism to refeeding in crabs fed with HP diet differs from the one observed in crabs fed with HC diet.

Refeeding with HP diet for 72-120 h did not change markedly ^{14}C -MeAIB uptake, ^{14}C -glycine oxidation and protein synthesis. However, the ability to synthesize lipids from ^{14}C -glycine remained high throughout the period of refeeding with the HP diet. This finding corroborates the increase in gluconeogenic and glyconeogenic activities from lactate by muscle during refeeding with HP diet (Pellegrino et al., 2008). Moreover, after 48 h refeeding with HP diet, the incorporation of ^{14}C from glucose into lipids in muscle did not change significantly (Vinagre and Da Silva, 2002). It is noteworthy that in HP group, 15-day fasting did not significantly affect glycogen and protein levels in muscle. Thus, in this study, this high lipogenic activity from amino acids in muscle is in agreement with the high total lipid content found in *N. granulata* fed HP diet (Kucharski and Da Silva, 1991a). Furthermore, muscle lipids are important source of energy in *N. granulata* used during osmoregulation and winter (Kucharski and Da Silva, 1991b; Luvizzoto-Santos et al., 2003; Martins et al., 2011).

In conclusion, *N. granulata* relies on metabolic strategies to withstand starvation. Changes in the carbon amino acids flux between different metabolic pathways in muscle are among the strategies used by this crab to face starvation and refeeding. Protein or carbohydrate levels in the diet administered to this crab modulate the carbon flux between the different metabolic pathways.

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., L.C.K., R.P. are CNPq fellows.

References

- Barclay, M.C., Dall, W., Smith, D.M., 1983. Changes in lipid and protein during starvation and the moulting cycle in the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 68, 229-244.
- Barnes, H., Blackstock, J., 1993. Estimation of lipid in marine animals and tissues: detailed investigation of sulphophosphovanillin method for total lipids. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 12, 103-118.
- Bianchini, A., Lauer, M.M., Nery, L.E.M., Colares, E.P., Monserrat, J.M., Santos, E.A., 2008. Biochemical and physiological adaptations in the estuarine crab *Neohelice granulata* during salinity acclimation. Comp. Biochem. Physiol. A 151, 423-436.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Chan, L.P., Swaminathan, R., 1986. Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination. Clin. Chem. 32.
- Chittó, A.L.F., Schein, V., Etges, R., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2009. Effects of photoperiod on gluconeogenic activity and total lipid concentration in organs of crabs, *Neohelice granulata*, challenged by salinity changes. Invertebr. Biol. 128, 261-268.
- Comoglio, L., Smolko, L., Amin, O., 2005. Effects of starvation on oxygen consumption, ammonia excretion and biochemical composition of the hepatopancreas on adult males of the False Southern King Crab *Paralomis granulosa* (Crustacea, Decapoda). Comp. Biochem Physiol. B. 140, 411-416.
- Comoglio, L., Goldsmit, J., Amin, O., 2008. Starvation effects on physiological parameters and biochemical composition of the hepatopancreas of the southern king crab *Lithodes santolla* (Molina, 1782). Rev. Biol. Mar. Oceanog. 43, 345-353.
- Dall, W., Smith, D.M., 1986. Oxygen consumption and ammonia excretion in fed and starved tiger prawns, *Penaeus esculentus* Haswell. Aquaculture. 55, 23-33.
- De Feo, P., Di Loreto, C., Lucidi, P., Murdolo, G., Parlanti, N., De Cicco, A., Piccioni, F., Santeusano, F., 2003. Metabolic response to exercise. J. Endocrinol. Invest. 26, 851-854.
- D'Incao, F., Ruffino, M.L., Silva, K.G., Braga, A.C., 1990. Hábito alimentar de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae) na barra de Rio Grande, RS. Atlântida. 12, 85-93.
- Drach, F., Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. Vie Milieu. 161, 595-607.
- Erchao, L., Arena, L., Lizama, G., Gaxiola, G., Cuzon, G., Rosas, C., C Liqiao., Van Wormhoudt, A., 2011. Glutamate dehydrogenase and Na⁺-K⁺ATPase expression and growth response of *Litopenaeus vannamei* to different salinities and dietary protein levels. Chin. J. Oceanol. Limn. 29, 343-349.
- Esmann, M., 1988. ATPase and phosphatase activity of Na⁺-K⁺ATPase: Molar and specific activity, protein determination. Meth. Enzimol. 156, 105-115.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, H.S., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 226, 497-503.
- Gering, F.S., De Oliveira, L.F.F., Dutra, B.K., Oliveira, G.T., 2009. Biochemical composition, lipoperoxidation, Na⁺-K⁺ATPase activity and reproduction of *Hyalella castroi* (Amphipoda, Dogielinotidae) fed with different diets. J. Exp. Zool. Part A. 311, 408-421.
- Guidotti, G.G., Gazzola, G., 1992. In: Kilberg, M.S., Häussinger, D. (Eds.), Mammalian Amino Acid Transport. Mechanisms and Control. Plenum Press, New York.

- Hardy, D., Dutil, J.D., Godbout, G., Munro, J., 2000. Survival and condition of hard shell male adult snow crabs (*Chionoecetes opilio*) during fasting at different temperatures. *Aquaculture*. 189, 259-275.
- Hervant, F., Mathieu, J., Barre, H., 1999. Comparative study on the metabolic responses of subterranean and surface-dwelling amphipod crustaceans to long-term starvation and subsequent refeeding. *J. Exp. Biology*. 202, 3587-3595.
- Hervant, F., Renault, D., 2002. Long-term fasting and realimentation in hypogean and epigean isopods: a proposed adaptive strategy for groundwater organisms. *J. Exp. Biol.* 205, 2079-2087.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991a. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A*. 99, 215-218.
- Kucharski, L.C.R., Da Silva, R.S.M., 1991b. Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A*, 100, 599-602.
- Luvizotto-Santos, R., Lee, J.T., Branco, Z.P., Bianchini, A., Nery, L.E.M., 2003. Lipids as energy source during salinity acclimation in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea-Grapsidae). *J. Exp. Zool. Part. A*. 295, 200-205.
- Marqueze, A., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 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.
- Martins, T.L., Chittó, A.L.F., Rossetti, C.L., Brondani, C.K., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2011. Effects of hypo- or hyperosmotic stress on lipid synthesis and gluconeogenic activity in tissues of the crab *Neohelice granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 158, 400-405.
- Mayrand, E., Dutil, J.D., Guderley, H., 2000a. Changes in muscle of postmoult snow crabs *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) fed different rations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 243, 95-113.
- Mayrand, E., Guderley, H., Dutil, J.D., 2000b. Biochemical indicators of muscle growth in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 255, 37-49.
- McCue, M.D., 2010. Starvation physiology: Reviewing the different strategies animals use to survive a common challenge. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 156, 1-18.
- Oliveira, G.T., Rossi, I.C., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting in crabs previously maintained on a high-protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A*. 137, 383-390.
- Pascual, C., Sánchez, A., Zenteno, E., Cuzon, G., Gabriela, G., Brito, R., Gelabert, R., Hidalgo, E., Rosas, C., 2006. Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 251, 416-429.
- Pellegrino, R., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2008. Effect of fasting and refeeding on gluconeogenesis and glyconeogenesis in the muscle of the crab *Chasmagnathus granulatus* previously fed a protein- or carbohydrate-rich diet. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 358, 144-150.
- Pinoni S.A.; Mañanes, A.A.L., 2009. Na⁺, ATPase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: Differential response to environmental salinity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 372, 91-97.
- Richardson, N.A.; Andreson, A.J; Sara, V.R., 1997. The effects of insulin/IGF-1 on glucose and leucine metabolism in the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Gen. Comp. Endocr.* 105, 287-293.

- Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Pascual, C., Taboada, G., Arena, L., Van Wormhoudt, A., 2002. An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268, 47-67.
- Sánchez-Paz, A., Garcia-Carreno, F., Hernandez-Lopez, J., Muhlia-Almazan, A., Yepiz-Plascencia, G., 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 340, 184-193.
- Schein, V., Chittó, A.L.F., Etges, R., Kucharski, L.C., Wormhoudt, A.V., Da Silva, R.S.M., 2005. Effect of hyper or hypo-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 140, 561-567.
- Turcato, G.S., 1990. Estudo bioecológico do caranguejo do estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Master Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Valle, S.C., Eichler, P., Maciel, J.E., Machado, G., Kucharski, L.C., Da Silva, R.S.M., 2009. Seasonal variation in glucose and neutral amino acid uptake in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Comp Biochem Physiol. A.* 153, 252-257.
- Vinagre, A.S., 1992. Efeito da adaptação prévia a uma dieta rica em carboidratos ou rica em proteínas sobre o padrão de resposta metabólica ao jejum do caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Master Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Vinagre, A.S., 1999. Metabolismo de carboidratos no caranguejo *Chasmagnathus granulata*: efeito do jejum e da realimentação sobre a adaptação ao estresse hiposmótico. Ph.D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.
- Vinagre, A.S., Da Silva, R.S.M., 1992. Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 102, 579-583.
- Vinagre, A.S., Da Silva, R.S.M., 2002. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Can. J. Zool.* 80, 1413-1421.

Tables and Figures

Table 1. Effect of fasting and different times of refeeding (R) on the protein concentration in jaw muscle of *N. granulata* previously fed a high-protein (HP) or carbohydrate-rich (HC) diet

	PROTEIN g%	
	HC	HP
Fed	4.90±0.30 (10)	4.46±0.93 (7)
Fasted	4.45±1.02 (5)	4.29±1.14 (5)
R 72h	4.87±0.81 (5)	4.51±1.09 (5)
R 96h	4.96±0.33 (5)	5.21±0.19 (5)
R 120h	5.01±0.22 (5)	4.86±0.37 (5)

Data are given as means ± S.D. Number of male crabs in brackets.

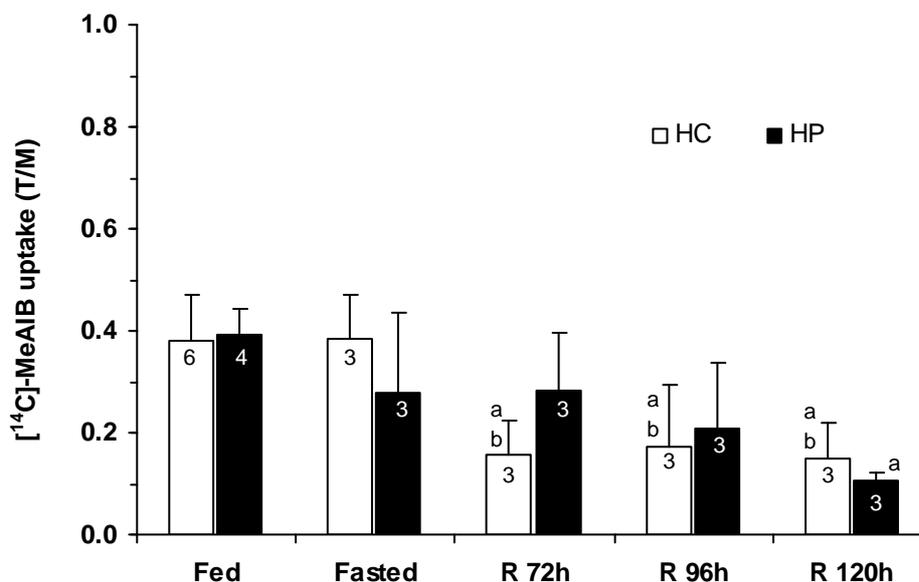


Fig.1. Effect of fasting and different times of refeeding on the uptake of [¹⁴C]-MeAIB in the jaw muscle of *N. granulata* previously fed a HC or HP diet. Data are given as means ± S.D. Number of crabs indicated inside the bars. (a) indicate significantly different from the fed group; (b) indicate significantly different from the fasting group. (T/M) indicate tissue/medium.

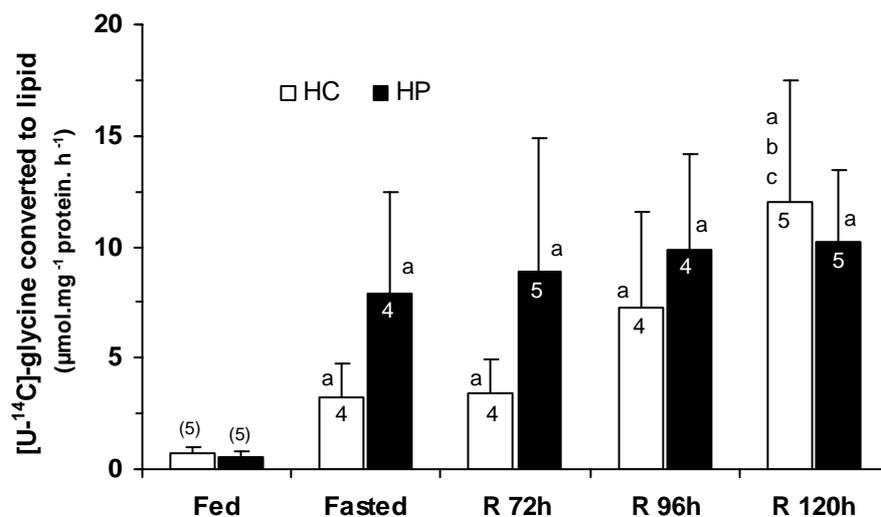


Fig.2. Effect of fasting and different times of refeeding on the [¹⁴C]-glycine conversion to ¹⁴C-lipids in the jaw muscle of *N. granulata* previously fed a HC or HP diet. Data are given as means ± S.D. Number of crabs indicated inside the bars. (a) indicate significantly different from the fed group; (b) indicate significantly different from the fasting group; (c) indicate significantly different from the R72h group; (5) indicate number of crabs.

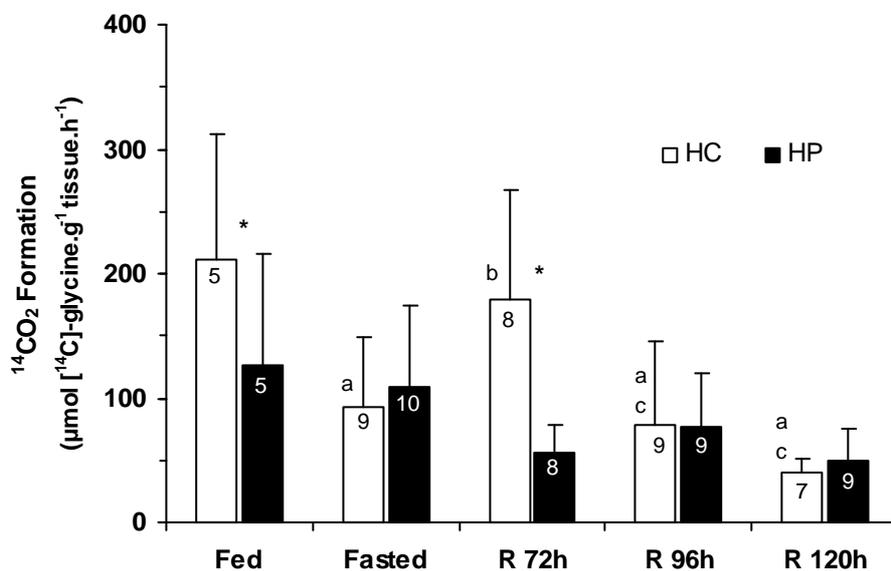


Fig.3. Effect of fasting and different times of refeeding on ¹⁴CO₂ formation in the jaw muscle of *N. granulata* previously fed a HC or HP diet. Data are given as means ± S.D. Number of crabs indicated inside the bars. The superscripts indicate significant different (*) (P<0.05) between diets; (a) indicate significantly different from the fed group; (b) indicate significantly different from the fasting group; (c) indicate significantly different from the R72h group.

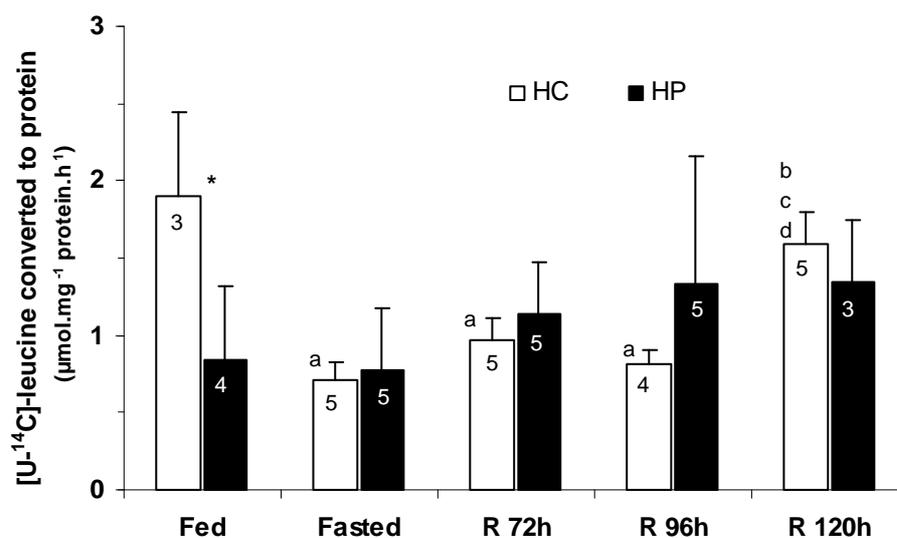


Fig.4. Effect of fasting and different times of refeeding on the ^{14}C -leucine conversion to ^{14}C -protein in the jaw muscle of *N. granulata* previously fed a HC or HP diet. Data are given as means \pm S.D. Number of crabs indicated inside the bars. The superscript indicates significant difference (*) ($P < 0.05$) between diets; (a) indicates significantly different from the fed group; (b) indicates significantly different from the fasting group; (c) indicates significantly different from the R72h group; (d) indicates significantly different from the R96h group.

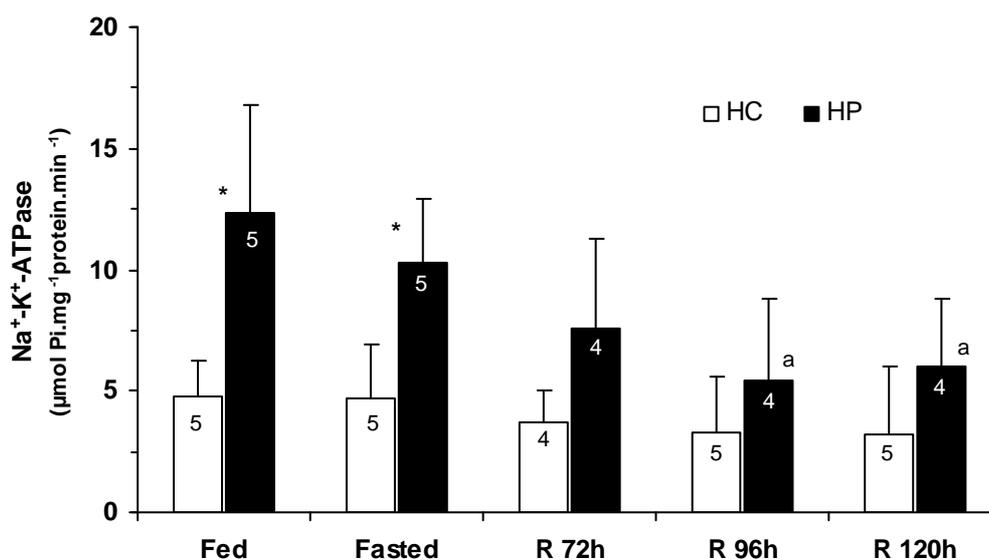


Fig.5. Activity $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ during fasting and subsequent times of refeeding in the jaw muscle of *N. granulata* previously fed a HC or HP diet. Data are given as means \pm S.D. Number of crabs indicated inside the bars. The superscripts indicate significant difference (*) ($P < 0.05$) between diets; (a) indicates significantly different from the fed group.

