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

EFEITOS DO ESTRESSE HIPOSMÓTICO E HIPEROSMÓTICO, *IN VITRO*, SOBRE A SÍNTESE DE PROTEÍNAS, MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS, CAPTAÇÃO E OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM TECIDOS DO CARANGUEJO *Chasmagnathus granulatus*

CARMEN LIANE BOCK

PORTO ALEGRE, JULHO 2005

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

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@vortex.ufrgs.br
Rua Sarmento Leite, 500 - 2 º andar
90050-170 - Porto Alegre – RS – Brasil

Fone/Fax: (051) 3316-3453

EFEITOS DO ESTRESSE HIPOSMÓTICO E HIPEROSMÓTICO, *IN VITRO*, SOBRE A SÍNTESE DE PROTEÍNAS, MOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS, CAPTAÇÃO E OXIDAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM TECIDOS DO CARANGUEJO *Chasmagnathus granulatus*

CARMEN LIANE BOCK

ORIENTADORA:
Dra. Roselis Silveira Martins da Silva

CO-ORIENTADOR:
Dr. Luiz Carlos Rios Kucharski

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Fisiologia

PORTO ALEGRE, JULHO DE 2005

Ao meu filho William

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de morar nesta cidade, e pelas mais diferentes aprendizagens durante o tempo em que mantive contato com todas as pessoas que conheci ao longo do mestrado.

De uma forma bem especial, quero externar meus agradecimentos para:

A professora Dra. Roselis, pela sabedoria e conhecimentos compartilhadados, pelo apoio nos momentos difíceis, pela paciência e pela amizade.

O professor Dr. Luiz Carlos, pela dedicação, paciência, conhecimentos e amizade.

A professora Dra. Ilma,, com a qual fiz os primeiros contatos em 2000, por abrir para mim as portas do que até então era muito desconhecido.

A Lucia, pela incansável ajuda, dedicação e trabalho. Deixar a praia nas férias para vir a Porto Alegre fazer experimentos, não é qualquer um que encara!

Os meus pais, pelo exemplo de luta, e pelo apoio e carinho a distância.

O Miguel, pela ajuda, compreensão, carinho e exemplo de otimismo e força.

A amiga Mere, a qual se tornou, ao longo desses dois anos, muito mais que uma amiga. Ela foi agente direto no processo do auto conhecimento e crescimento pessoal ao longo dessa caminhada. A orla do Guaíba e o pôr do sol são testemunhas disso.

A Letícia, que acima de amiga foi muito companheira “em todas”.

O Zé, pelo companheirismo e alegria.

A amiga Elza, pela amizade e os bons e longos momentos de estudo que juntas tivemos; as tortas e cafés são cúmplices!

Os amigos Nei Muller, Bruno T. Bock e Sergio Michels, pelo incentivo.

O Sérgio Blum, pela assessoria em informática.

A Dona Leda e a Dona Leonor, pelo envolvimento com o William, na minha ausência.

Todos os colegas do laboratório: Ana Lúcia, Rogério, Márcia, Ubirajara, Glauco, Matheus, Gabriela, Alessandra, Sandra, Ricardo, Felipe, Inajara, Alan, Rodrigo, Yan e Vanessa pelos mais diversos momentos de aprendizagem, auxílios e amizade.

A Danielle, a Fabiana e a Luciana pela ajuda nos experimentos e pela “especialização em brânquias”.

O Luciano, que ajudou “na entrada: glicemia” e “na saída: oxidação”.

A Dona Ritinha, pela manutenção do material radioativo.

Os funcionários, colegas e professores do curso de Pós-graduação em Fisiologia, pela convivência e amizade.

O CNPq, FAPERGS e PROPESQ pelo apoio financeiro ao Laboratório e ao curso de Pós-Graduação em Fisiologia.

SUMÁRIO

RESUMO 07

1. INTRODUÇÃO 09
2. OBJETIVOS 19
3. MATERIAL E MÉTODOS 20
4. ARTIGO DESENVOLVIDO 27

   Effects of hyper- and hypo-osmotic stress, *in vitro*, on protein synthesis, protein mobilization, amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulatus*

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS …….. 58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

RESUMO

Em crustáceos, ainda não são conhecidas as fontes de aminoácidos e as rotas metabólicas envolvidas no controle da concentração intracelular de aminoácidos.

Os experimentos deste trabalho tiveram como objetivo investigar se o estresse osmótico provoca alterações intrínsecas sobre o metabolismo de aminoácidos nos tecidos de *C. granulatus* submetidos a estresse agudo *in vitro*. Medimos a síntese e a mobilização de proteínas, a captação de aminoácidos e a produção de $^{14}CO_2$ a partir de ^{14}C-leucina no hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias anteriores e posteriores submetidos a estresse hipo e hiperosmótico agudo, *in vitro*.

O controle da síntese de proteínas parece estar envolvido no ajuste metabólico da concentração intracelular de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias submetidos à alteração osmótica aguda, *in vitro*. Por outro lado, durante o estresse hiposmótico agudo, *in vitro*, a diminuição na captação de aminoácidos via sistema A e o aumento na oxidação total de ^{14}C-L-leucina foram usados como mecanismos para reduzir as concentrações intracelulares de aminoácidos nas brânquias posteriores e anteriores, respectivamente. A captação de aminoácidos e a mobilização de ^{14}C-proteina não foram mecanismos usados para aumentar a concentração intracelular de aminoácidos em todos os tecidos estudados.

Palavras chave: síntese e mobilização de proteínas; captação e oxidação de aminoácidos; hepatopâncreas, músculo mandibular; brânquias anteriores e posteriores; estresse osmótico.

1. INTRODUÇÃO

A capacidade osmorreguladora está relacionada com a manutenção de um meio interno compatível com as funções celulares. A aquisição da capacidade osmorreguladora desempenhou um importante papel na evolução.

Os crustáceos apresentam vários tipos de estratégias osmorreguladoras (Prosser, 1973), podendo ser: osmoconformadores (não regulam a osmolalidade de seus fluidos, conformando-se à osmolalidade do meio) ou osmorreguladores (mantém a sua osmolalidade interna razoavelmente constante, independentemente do meio em que estão imersos). Entre os Crustáceos Decápodas, encontram-se desde animais marinhos eurialinos com pouca ou nenhuma capacidade osmorreguladora, portanto tolerantes a pequenas variações de salinidade, até animais estuarinos eurialinos capazes de tolerar grandes variações de salinidade do meio, e com mínimas alterações da concentração osmótica da hemolinfa (Gilles e Delpire, 1997; Gilles, 1997). De acordo com Gilles e Delpire (1997), crustáceos eurialinos apresentam dois mecanismos básicos para enfrentar um estresse osmótico: (a) regulação anisosmótica do fluido extracelular, a qual implica no controle da osmolalidade da hemolinfa independente da osmolalidade do meio externo; (b) regulação isosmótica do fluido intracelular, o que implica em um controle da osmolalidade do fluido e do volume intracelular, com o objetivo de mantê-lo isosmótico em relação ao extracelular.

O processo de regulação anisosmótica do fluido extracelular resulta de um balanço entre os fenômenos de efluxo e influxo de efetores osmóticos, principalmente íons e água. Os principais componentes fisiológicos desse balanço entre os efetores osmóticos e a água são a permeabilidade da superfície corporal e o transporte ativo, principalmente nas brânquias, trato intestinal e órgãos excretores (Gilles e Delpire, 1997; Gilles 1997).

O termo regulação isosmótica do fluido intracelular defini os mecanismos responsáveis pelo ajuste ativo da pressão osmótica intracelular em relação a novas pressões osmóticas dos fluidos corpóreos, impedindo assim grandes alterações na concentração intracelular (Jenieux e cols., 1961).

Várias adaptações permitiram aos crustáceos eurialinos ocuparem habitats estuarinos e dulciaqüículas: 1) redução da concentração dos líquidos corporais até valores compatíveis com a função celular; 2) redução da ingestão de água; 3) redução da permeabilidade do tegumento; 4) aumento da excreção de água através da glândula antenal; 5) presença de sistemas de transporte ativo de solutos. Por meio dessas estratégias os gastos energéticos para a manutenção de gradientes osmóticos iônicos elevados são reduzidos (Martel e Farmer, 1983; Gilles e Delpire, 1997).

O *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) é um caranguejo que ocorre no litoral do Brasil do Rio de Janeiro até o Rio Grande do Sul. Também é encontrado no litoral do Uruguai e da Argentina até o Golfo de San Martín. Este caranguejo caracteriza-se como uma espécie tipicamente estuarina, habitando pântanos salgados (marismas). Os estuários são ecossistemas resultantes da transição entre os ambientes marinho e límnico, caracterizando-se por períodos irregulares de total cobertura com água e outros de completa exposição do substrato (Odum, 1985). Em estuários e marismas as variações extremas dos fatores ambientais exercem um controle seletivo e severo sobre as espécies que habitam essas áreas. Os organismos estuarinos devem ser capazes de tolerar alterações freqüentes das características físicas e químicas do ambiente, devido a alternância no predomínio de água de origem marinha ou límnica na massa de água total (Odum, 1985). Em seu habitat, o *C. granulatus* distribui-se entre os pisos supra e mesolitorâneos, em áreas inundáveis com ou sem vegetação halo-hidrófila. Nesses locais, os animais abrem galerias ou tocas com

profundidades variáveis, de acordo com o nível das marés e do lençol freático, fazendo com que sempre haja água no fundo da toca. Essas habitações têm importância na ecofisiologia dessa espécie, pois protegem os caranguejos das amplitudes de variações de salinidade e de temperatura do ambiente (Botto e Irigoyen, 1980).

A família Grapsidae é bem diversa e quase todos os seus membros mostram algum grau da adaptação terrestre, como a presença de tufos de cerdas entre as bases dos pereiópodos, com a função de transferir a água para dentro da câmara branquial; a capacidade de manter uma corrente de circulação de água da câmara branquial através da superfície externa do corpo com a finalidade de oxigená-la (Hartnoll, 1988). Esse caranguejo no seu habitat, permanece muitas horas fora d'água.

Na lagoa Tramandaí, habitat do *C. granulatus* utilizado como modelo experimental neste estudo, Turcato (1990) verificou uma variação do teor de oxigênio dissolvido de 2,78 mgO_2/l até 11,78 mgO_2/l e da salinidade de 0,22 $^0/_{00}$ até 34 $^0/_{00.}$ Conforme Bromberg (1992) esse animal pode ser classificado como um regulador hiper-hiposmótico eurialino, pois suporta variações de salinidade de 0‰ até 40‰, hiper-regulando de 0‰ até 20‰ e hipo-regulando em 40‰. O ponto isosmótico situa-se entre 28,5‰ e 30‰, no inverno e verão, respectivamente.

Devido a excelente adaptação às condições de laboratório, o caranguejo *C. granulatus* é considerado um modelo biológico muito adequado para o estudo do metabolismo intermediário em invertebrados (Kucharski, 1990). Como se trata de uma espécie que vive em estuário, tolerando alterações freqüentes de salinidade é um modelo biológico ideal para a investigação dos mecanismos envolvidos na aclimatação ao estresse hiper ou hiposmótico.

Leon Fredericq, fundador do Instituto de Fisiologia da Universidade de Liège, em 1885, observou que a concentração de íons nos tecidos de invertebrados e vertebrados

marinhos inferiores, como elasmobrânquios era diferente daquela observada no meio ambiente em que viviam (Gilles, 1997).

Nos anos de 1930, Marcel Florkin, um dos fundadores da bioquímica comparativa, aclimatou espécies de invertebrados à água marinha ou à água diluída, com o objetivo de estudar as substâncias orgânicas citadas por Fredericq em 1885. Ele observou que no caranguejo *Eriocheir sinensis* a concentração total de aminoácidos livres no músculo aumento duas vezes quando os animais foram transferidos da água diluída para a água do mar. O mesmo resultado foi constatado por Shaw, três anos depois, quando transferiu o caranguejo eurialino *C. maenas* de um meio diluído para a água do mar (Gilles, 1997).

Os aminoácidos exercem muitas funções nos processos biológicos como: 1) precursores na biossíntese de proteínas, glicose e lipídios; 2) desempenham papel de doadores/transportadores de átomos de carbono e nitrogênio; 3) fornecem energia; 4) têm funções como neurotransmissores ou neuromoduladores; 4) participam de sistemas de tamponamento dos organismos; 5) agem como osmólitos (Kilberg e Häussinger, 1992).

Está bem documentado na literatura especializada, que crustáceos mantêm uma concentração de aminoácidos livres intracelulares que, aliados a compostos nitrogenados como óxidotrimetilamino e betaína, perfazem 50 a 60% dos efetores osmóticos nessa superclasse (Huggins e Munday, 1968; Gilles, 1997). Em crustáceos, a concentração de aminoácidos é cerca de 10 vezes maior que aquela nos tecidos de mamíferos; sendo a arginina, a alanina, a glicina, a prolina, o ácido glutâmico e a taurina os mais importantes. A contribuição relativa de cada aminoácido aos ajustes osmóticos pode variar entre as espécies e entre os diversos tecidos de uma mesma espécie (Huggins e Munday, 1968; Gilles, 1997; Gilles e Delpire, 1997).

Vários estudos mostram um aumento na concentração de aminoácidos nos tecidos de invertebrados quando submetidos a estresse hiperosmótico (Okuma e Abe, 1994; Matsuchita e Hayashi, 1992; Bishop e cols., 1994; Dragolovich e Pierce, 1992). Contudo, durante o choque hiperosmótico, os níveis hemolinfáticos de proteínas e aminoácidos livres diminuem (Koening, 1981; Tan e Choong, 1981; Freire e cols., 1995), indicando que as proteínas hemolinfáticas e tissulares possam ser fontes de aminoácidos livres durante esse processo.

Schein (1999) mostrou que em *C. granulatus* submetido ao estresse hiperosmótico, as concentrações de glicina, alanina, serina, arginina e prolina diminuiram na hemolinfa, sugerindo que estes aminoácidos estariam sendo captados pelos tecidos e envolvidos no processo de aclimatação ao meio hiperosmótico neste caranguejo.

Em axônios isolados de crustáceos submetidos ao estresse hiposmótico, foi demonstrado um aumento do efluxo e uma diminuição do influxo dos aminoácidos do tecido (Gilles, 1977; Pequeux e Gilles, 1979).

Alguns trabalhos têm demonstrado que, em neurônio isolado de *Eriocheir sinensis*, dois mecanismos parecem envolvidos na regulação da concentração de aminoácidos durante o choque osmótico: modificações na permeabilidade da membrana plasmática; e modificações na atividade das enzimas responsáveis pelo metabolismo desses aminoácidos (Gilles e Schoffeniels, 1969).

Em *Eriocheir sinensis* e em uma espécie do gênero *Homarideo* foram constatadas alterações nas atividades de diversas enzimas envolvidas no metabolismo dos aminoácidos quando submetidos à estresse hiper-ou hiposmótico (Gilles e Schoffeniels, 1969; Gilles, 1969).

A partir de vários estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, Gilles (1982; 1997) postula a ocorrência, durante o ajuste osmótico, de mudanças na concentração de aminoácidos livres

tissulares, 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 oxidação destes aminoácidos livres tissulares; (3) modificações na capacidade de síntese e degradação de proteínas.

Recentemente, Schein e cols. (2005b) verificaram, no hepatopancreas e no músculo de *C. granulatus,* 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. Entretanto, em caranguejos submetidos ao estresse hiposmótico a oxidação total de aminoácidos não seria um dos mecanismos envolvidos na redução da concentração intracelular de aminoácidos nos tecidos hepatopancreático e muscular (Schein e cols., 2005).

Em vertebrados, quatro principais sistemas de transporte de aminoácidos foram identificados com base na especificidade ao substrato e a dependência aos íons. Os principais sistemas de transporte para os diferentes aminoácidos são: A, ASC, N e L. Os sistemas A, ASC e N são regulados pela insulina, enquanto o sistema L é insensível a ação deste hormônio. O sistema ASC transporta alanina, serina e cisteína. O sistema N transporta glicina, histidina e asparagina, e o sistema L transporta aminoácidos neutros como a leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, ciclo-leucina e também o análogo AIB (ácido aminoisobutírico). O sistema A transporta aminoácidos neutros como a alanina, serina, glicina, metionina, glutamina e prolina, bem como o análogo Me-AIB (ácido metil-aminoisobutírico). Os sistemas A e ASC são dependentes da presença de sódio e são alvo da regulação hormonal (Tessari, 1994).

A captação de aminoácidos pelo sistema A é regulada pelo gradiente eletroquímico de Na^+ (Norman e Mann, 1988). A remoção do íon sódio do meio extracelular produz uma

inibição do transporte via sistema A (Bikhazi e cols., 1985). Devido a dependência do sistema A ao fluxo iônico de Na^+, um aumento no gradiente eletroquímico transmembrana deste íon, pode produzir um aumento na captação de aminoácidos através desse sistema (Lerner, 1985). A manutenção do gradiente eletroquímico é promovida basicamente pela bomba Na^+/K^+ ATPase. O funcionamento deficiente da bomba resulta em um aumento da concentração de Na^+ intracelular, reduzindo o gradiente de Na^+, ao qual está acoplado o transporte de aminoácidos.

Para o estudo do transporte de aminoácidos em preparações biológicas são amplamente utilizados o ácido aminoisobutírico (AIB) e o ácido α-metil-amino isobutírico (Me-AIB) ligados a elementos radioativos (^{14}C, ^{3}H). Estes aminoácidos não são metabolizados pelas células, acumulando-se em seu interior de uma maneira semelhante aos aminoácidos naturais (Debons e Pittman, 1962). O Me-AIB é utilizado em estudos para a identificação de transporte de aminoácidos via sistema A. O análogo AIB pode ser transportado tanto pelo sistema A (transporte ativo dependente de sódio) quanto pelo L (difusão facilitada).

O principal monossarídeo na hemolinfa de crustáceos é a glicose (Hereid e Full, 1988; Morris e Airries, 1998). Diversos fatores influenciam a concentração hemolinfática de glicose em crustáceos, pode-se salientar: o estágio da muda, influência sazonal e circadiana, a dieta oferecida, o estado alimentar, o teor de oxigênio no meio e a regulação hormonal via hormônio hiperglicemiante (CHH) (Chang e O' Connor, 1983; Kucharski e Da Silva, 1991 a; b; Da Silva e Kucharski, 1992; Morris e Airriess, 1998; Oliveira e Da Silva, 2000; Vinagre e Da Silva, 2002; Oliveira e cols., 2001; 2004 a; b).

A participação do metabolismo de carboidratos durante o processo de aclimatação ao estresse hiper e hiposmótico foi constatada no caranguejo *C. granulatus* (Da Silva e

Kucharski, 1992; Schein, 1999; Oliveira e Da Silva, 2000; Chittó, 2000; Schein e cols., 2004; 2005 a;b). A diminuição na concentração de glicose livre nas brânquias anteriores e posteriores durante o estresse hipo e hiperosmótico (Chittó, 2000; Vinagre, 1999) indica a utilização desta hexose como fonte de energia durante a aclimatação ao estresse osmótico. Eichler (2001) sugere que as brânquias seriam os órgãos com maior consumo de energia durante o processo de osmorregulação.

A via gliconeogênica hepatopancrática também participaria no ajuste da concentração de aminoácidos durante a aclimatação ao estresse hiposmótico em *C. granulatus* (Oliveira e Da Silva, 2000). Mais recentemente, Schein e cols. (2004; 2005 a;b) demonstraram a presença da via gliconeogênica no músculo de *C. granulatus* e a participação desta via nos ajustes metabólicos neste tecido durante a aclimatação aos meios hiper- e hiposmótico em *C. granulatus.*

Kucharski e cols. (1997) demonstraram, *in vivo* e *in vitro*, a presença de receptores à insulina em brânquias do caranguejo *C. granulatus*. Estes receptores apresentam propriedades semelhantes àquelas observadas em receptores de insulina em tecidos-alvo clássicos de vertebrados. Kucharski e cols. (1999) também demonstraram que os receptores à insulina nas brânquias do caranguejo *C. granulatus* pertenciam à família tirosina quinase como os receptores de mamíferos. Estes autores sugerem que no *C. granulatus* a transdução do sinal da insulina em células branquiais é similar àquela de mamíferos: ligação do hormônio à subunidade α, autofosforilação da subunidade β, fosforilação de proteínas citoplasmáticas. Estudos *in vitro*, demonstraram que a insulina de mamífero estimula a captação de glicose e síntese de glicogênio somente nas brânquias posteriores (Kucharski e cols., 2002). Recentemente, foi realizada a clonagem parcial da região tirosina quinase do receptor de insulina (CIRR) a partir do tecido branquial de *C. granulatus* (Trapp e cols., 2002). A

administração de insulina de mamífero durante 8 dias em *C. granulatus* aumentou significativamente a atividade da enzima Na^+-K^+-ATPase e a captação de aminoácidos nas brânquias posteriores (Martins, 2003). No hepatopâncreas este hormônio também estimulou a captação de ^{14}C-AIB, contudo, não apresentou efeito significativo sobre a síntese de proteínas em hepatopâncreas, músculo, brânquias anteriores e posteriores (Martins, 2003). Estes dados sugerem a participação da insulina no processo de osmorregulação em *C. granulatus*.

Recentemente, Trapp e cols. (2004) demonstraram redução no número, afinidade e atividade tirosina quinase do receptor de insulina em brânquias posteriores de *C. granulatus* submetido ao estresse hiperosmótico durante 144 horas.

Eckhardt e cols. (1995) verificaram o envolvimento da glândula do seio no controle neuroendócrino da osmoregulação em *Pachygrapsus marmoratus* e concluiram que esta glândula contém um peptídio que influencia, diretamente, a função branquial. Pierrot e cols. (2000) trabalhando com o mesmo caranguejo eurialino, aclimatado à água diluída, perfundiram as brânquias posteriores isoladas com o hormônio hiperglicêmico de crustáceos (CHH) obtido da glândula do seio; CHH aumentou a diferença do potencial transepitelial e o influxo de Na^+ em 50% nestes órgãos. Por esse motivo, os autores afirmaram ser este neuropeptídio o mais importante fator envolvido no controle da osmorregulação em crustáceos decápodos.

Charmantier-Daures (1994) demonstrou que uma isoforma de CHH estaria envolvida no processo de hiperosmorregulação em *H. americanus* aclimatado a baixa salinidade. Soyez e cols. (1994) identificaram esta isoforma de CHH como sendo o peptídio D-Phe^3 CHH. Chung e cols. (1999) também observaram uma ação direta de um peptídio semelhante ao CHH sobre os mecanismos envolvidos no processo de osmorregulação no caranguejo *Carcinus maenas*.

Serrano e cols. (2003) isolaram três diferentes isoformas de CHH (10SGeqiv: Z1, Z2 e Z3) de *Astacus leptodactylus* extraídas da glândula do seio, e as injetaram em animais apedunculados. Os autores constataram que a osmolalidade da hemolinfa e a concentração de Na^+ foi significativamente mais elevada nos animais injetados com a isoforma D-Phe^3 (Z3), as outras duas isoformas (Z1 e Z2) não aumentaram a osmolalidade da hemolinfa, mas aumentaram a concentração de Na^+ hemolinfático. Este trabalho mostrou, pela primeira vez, em crustáceo aclimatado à água doce, os efeitos das isoformas de CHH sobre a osmorregulação.

Em *C. granulatus*, o estresse hiposmótico aumenta os valores de glicose circulante (Da Silva e Kucharski, 1992).Vinagre (1999) constatou que a ablação bilateral dos pedúnculos oculares não alterou a resposta do metabolismo de carboidratos ao estresse hiposmótico em *C. granulatus.* A autora sugere a possibilidade de envolvimento de outros hormônios, de bioaminas, ou de isoformas de CHH produzidas fora da glândula do seio do pedúnculo ocular que agiriam aumentando os níveis circulantes de glicose durante o estresse hiposmótico.

2. OBJETIVOS

Gilles (1997) sugere três mecanismos básicos envolvidos na alteração da concentração de aminoácidos livres tissulares durante o ajuste osmótico: (1) deslocamento do equilíbrio entre influxo e efluxo dos aminoácidos através da membrana plasmática; (2) alterações na capacidade de síntese e oxidação destes aminoácidos livres tissulares; (3) modificações na capacidade de síntese e degradação de proteínas. Fatores endócrinos e neuroendócrinos provavelmente agem controlando estes três mecanismos. A submissão aguda dos tecidos aos estresses hipo e hiperosmótico, *in vitro*, possibilita avaliar a capacidade intrínseca dos tecidos em responder as alterações osmóticas do meio extracelular.

Desta forma os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito do estresse hiposmótico e hiperosmótico, *in vitro*, sobre o metabolismo de aminoácidos, por meio da síntese e mobilização de proteínas, captação e oxidação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo mandibular e brânquias (anteriores e posteriores) do caranguejo *Chasmagnathus granulatus.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos animais

O caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Dana, 1851) é encontrado em abundância na costa brasileira, a partir do litoral do Rio de Janeiro até a costa Argentina no litoral patagônico (Boschi, 1964). A coleta foi feita na margem leste da Lagoa de Tramandaí, Rio Grande do Sul, Brasil, em um ambiente estuarino, parcialmente coberto por vegetação halo-hidrófila e invadido por arroios que drenam a água de origem pluvial da planície costeira.

As coletas foram realizadas no verão do ano de 2003, verão e outono de 2004, e verão de 2005. A captura no sedimento areno-lodoso, dentro da água ou nas tocas foi feita manualmente, e caixas plásticas com água da lagoa foram usadas para transportar os caranguejos até o laboratório. Foram coletados e utilizados somente caranguejos machos adultos, no estágio C do período de intermuda, pesando entre 14 e 17 g. (Drach e Tchernigovtzeff, 1967).

3.2 Manutenção dos animais no laboratório

Logo após a coleta, para eliminar parasitas e limpar o conteúdo estomacal, os animais foram mantidos no laboratório durante 24 horas em tanques aerados contendo água destilada. Após esta aclimatação os caranguejos foram transferidos para o ambiente controle por 10 dias, ou seja, em aquário com salinidade de $20^{0}/_{00,}$ temperatura de 25°C $\pm$ 2°C, fotoperíodo natural e oxigenação constante. A alimentação consistia de carne bovina crua, *ad libitum*, administrada diariamente no final da tarde, período de maior atividade dos animais.

3.3 Determinação da osmolalidade dos meios de incubação

Para determinar a osmolalidade dos meios de incubação, 3 grupos de caranguejos permaneceram durante 6 dias em 3 aquários com as seguintes osmolalidades: 0 mOsm/Kg de H_2O estresse hiposmótico; 900 mOsm/Kg de H_2O estresse hiperosmótico; 470 mOsm/Kg de H_2O meio controle. No final do período experimental, amostras de hemolinfa foram coletadas da articulação da quela do 4º e 5º pereiópodo utilizando seringas com anticoagulate oxalato de potássio 10% e usadas para a determinação da osmolalidade. Foi subtraída a osmolalidade do anticoagulante. A osmolalidade de cada amostra de hemolifa foi determinada imediatamente em osmômetro de pressão de vapor Wescor 5520 e os valores obtidos foram: 736 $\pm$ 16,02 mOsm/Kg de H_2O no meio hiposmótico, 881 $\pm$ 10,81 mOsm/Kg de H_2O no meio hiperosmótico e 777 $\pm$ 51,04 mOsm/Kg de H_2O no meio controle de 20‰. A partir destes dados os valores estabelecidos para submeter os tecidos ao estresse osmótico, *in vitro*, foram: 770 mOsm/Kg de H_2O para o grupo controle, 690 mOsm/kg de H_2O para o grupo hiposmótico e 900 mOsm/kg de H_2O para o grupo hiperosmótico.

Composição dos meios de incubação utilizados nos experimentos:

a) Controle (770 mOsm/Kg de H_2O) 374 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 8,8 mM H_3BO_3, 10 mM HEPES, 0,1 mM fenilmetilsufonil fluoride (PMSF), pH 7,8.

b) Estresse hiposmótico (690 mOsm/Kg de H_2O) 331 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 8,8 mM H_3BO_3, 10 mM HEPES, 0,1 mM fenilmetilsufonil fluoride (PMSF), pH 7,8.

c) Estresse hiperosmótico (900 mOsm/Kg de H_2O) 457 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 8,8 mM H_3BO_3, 10 mM HEPES, 0,1 mM fenilmetilsufonil fluoride (PMSF), pH 7,8.

3.4 Procedimentos experimentais *in vitro*

Após a aclimatação às condições padrão do laboratório, descritas acima, os animais foram crioanestesiados, os tecidos retirados rapidamente e colocados sobre gelo em placas de Petri com meio de incubação controle. Os tecidos utilizados foram hepatopâncreas, músculo mandibular, brânquias anteriores e posteriores. As artérias aferente e eferente das brânquias anteriores e posteriores foram retiradas e os órgãos receberam cortes nas lamelas branquiais, para permitir um maior contato entre o tecido e o meio de incubação. O hepatopâncreas e o músculo mandibular foram cortados em pedaços pequenos.

3.4.1 Síntese de proteínas

A síntese de proteínas foi determinada segundo Richardson e cols. (1997). Após o preparo dos tecidos, amostras (40-100 mg) de tecido hepatopancreático, muscular (mandibular) e branquial anterior e posterior foram secadas em papel de filtro e colocados em tubos de 2 ml contendo 0,5 ml de meio de incubação de acordo com o estresse ao qual os tecidos seriam submetidos *in vitro*: controle, hipo ou hiperosmótico. Ao meio foi acrescido 0,2 µCi de L-leucina-U-^{14}C (9,25 MBq/mmol, 310 mCi/mmol Amersham International) e 5 mM L-leucina. Os tubos foram então aerados por 30 segundos com carbogênio (O_2:CO_2, 95:5% v/v), fechados e incubados por 4 h (Schein, 1999) em banho metabólico a 25°C sob agitação constante. Ao término do tempo de incubação, as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Para a retirada do excesso de radioatividade dos tecidos, as amostras foram lavados por 2 vezes em meios de incubação gelados com a osmolalidade correspondente ao estresse de incubação, após secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 0,5 ml de água destilada. As amostras foram homogeneizadas com um macerador de

tecidos (Omni Mixer), sendo então uma parte processada para a quantificação de proteínas totais segundo o método de Bradford (1976), a albumina bovina foi usada como padrão. Para a quantificação de ^{14}C-proteínas sintetizadas, 100 µl das amostras foi aplicado em filtros de microfibra de vidro (GF/B, 24mm, Whatman). Após a secagem das amostras, os filtros foram incubados em TCA 10% por 10 min, para que ocorresse a precipitação das ^{14}C-proteínas. Posteriormente, os filtros foram lavados duas vezes em álcool 92,8% e duas vezes em éter, para eliminar os lipídios. Quando secos, os filtros foram submersos em 2,5 ml de líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a radioatividade quantificada em contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos em µmoles de L-U-leucina-^{14}C incorporada em proteínas por mg de proteína por hora.

3.4.2 Mobilização de proteínas

Neste experimento 70-200 mg de tecido (hepatopâncreas, músculo mandibular, brânquias anteriores e posteriores) foram submetidos ao protocolo de síntese protéica, conforme descrito acima, porém o meio de incubação foi igual para todos os tecidos, ou seja, foi usado apenas meio de incubação controle (770 mOsm/Kg de H_2O) acrescido de 0,2 µCi de L-leucina-U-^{14}C e 5 mM L-leucina.

Após 4 horas de incubação em banho metabólico a 25°C sob agitação constante, as reações foram interrompidas em banho de gelo, os tecidos foram lavados em meio de incubação controle, secos em papel filtro e então colocados em tubos de 2ml contendo os meios de incubação com diferentes osmolalidades: 690 mOsm/Kg de H_2O para o estresse hiposmótico, 900 mOsm/l para o estresse hiperosmótico e 770 mOsm/Kg de H_2O para controle. Os tubos foram aerados por 30 segundos com carbogênio (O_2:CO_2, 95:5% v/v) tampados e os tecidos submetidos ao estresse osmótico por 1 h em banho metabólico a 25°C

sob agitação constante. Após a incubação as reações teciduais foram interrompidas em banho de gelo. Para a retirada do excesso de radioatividade dos tecidos, as amostras foram lavadas por 2 vezes em meios de incubação gelados com a osmolalidade correspondente ao estresse de incubação, após secos em papel filtro e colocados em frascos contendo 0,5 ml de água destilada. Os tecidos foram homogeneizados com um macerador de tecidos (Omni Mixer), sendo então uma parte processada para a quantificação de proteínas totais segundo o método de Bradford (1976), onde foi utilizada albumina bovina como padrão. A quantificação de ^{14}C-proteínas foi realizada como descrito no item 3.4.1. A radioatividade do meio externo também foi determinada em contador LKB-Wallac. Os resultados foram expressos em µmoles de L-U-leucina-^{14}C incorporada em proteínas por mg de proteína por hora.

3.4.3 Captação de aminoácidos

Porções de 30 a 50 mg de hepatopâncreas, brânquias anteriores e posteriores e músculo mandibular foram utilizadas nesses experimentos. Após secagem em papel filtro, os tecidos foram divididos em 3 grupos e colocados em tubos de 2ml, contendo 0,5 ml de meio de incubação hiposmótico, hiperosmótico ou controle, acrescido de 0,2µCi de ácido amino-isobutírico (^{14}C -AIB) (9,25MBq/mmol, 250µCi/mmol, Du Pont) ou 0,2 µCi de ácido metil-aminoisobutírico (^{14}C-MeAIB) (9,25MBq/mmol, 250µCi/mmol, Du Pont). Os tubos foram pesados antes e após a colocação dos tecidos para a determinação do peso de cada amostra e, a seguir, foi feita a substituição, por 30 segundos, da fase gasosa por carbogênio (O_2:CO_2, 95:5% v/v). Os tubos foram fechados e incubados em banho metabólico durante 1 hora, a 25°C sob agitação constante. Este tempo de incubação foi determinado por Schein e cols. (2005 a). Após o período de incubação, as reações teciduais eram interrompidas em banho de

gelo, as amostras lavadas três vezes nos respectivos meios de incubação gelados, secas em papel filtro e colocadas em tubos do tipo pirex com tampa, contendo 1 ml de água bidestilada.

Os tubos foram congelados a -20°C e depois fervidos por 30 minutos. Este procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, com o objetivo de romper as células para ocorrer a liberação dos análogos captados, sendo que este meio foi considerado o meio interno e o meio de incubação foi considerado o meio externo.

Amostras de 100µl do meio interno e do externo foram dissolvidas em 5ml de coquetel de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) mais 500µl de água bidestilada. A radioatividade foi medida com um contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os resultados foram expressos pela relação entre a radioatividade contida no tecido (meio interno) e no meio de incubação (meio externo) (T / M: dpm / ml meio interno dividido dpm / ml do meio de incubação).

3.4.4 Produção de $^{14}CO_2$

Para a determinação da produção de $^{14}CO_2$, de acordo com De Oliveira e cols. (2002), porções de 70-100mg de hepatopâncreas, músculo mandibular, brânquias anteriores e posteriores foram coletadas dos animais previamente crioanestesiados e colocados em meio de incubação controle gelado. Em seguida os tecidos foram secos em papel filtro e colocados em vidros com tampa de borracha, contendo os meios de incubação com diferentes osmolalidades mais 0,2 µCi de L-leucina-U-^{14}C (9,25MBq/mmol, 310 mCi/mmol, Amersham International) e 10 mM L-leucina. Um poço de vidro contendo papel 3MM Whatman para a captação do $^{14}CO_2$ resultante da oxidação da ^{14}C-L-leucina foi preso às tampas de borracha. Os tecidos foram aerados com carbogênio (O_2:CO_2, 95:5% v/v), as tampas foram fechadas e vedadas com parafilme. A incubação foi de 1 hora segundo Schein (2003), a 25°C sob

agitação constante. A reação de oxidação foi interrompida após a injeção, através da tampa de borracha, de 0,25 ml de TCA 50% no meio de incubação e 0,25 ml de NaOH 2M nos poços de captação, para captar o $^{14}CO_2$ formado pela oxidação total da L-leucina-U-^{14}C. Os frascos vedados eram deixados em repouso por uma noite para a total captação do $^{14}CO_2$. Após eram acrescentadas 5 gotas de metanol nos poços e todo o pocinho era colocado em 10 ml do líquido de cintilação (Tolueno-Triton 2:1, PPO 0,4%, POPOP 0,01%) e a formação do $^{14}CO_2$ quantificada em um contador LKB-Wallac com 97% de eficiência. Os valores foram expressos em µmol por g de tecido por hora.

3.5 Tratamento estatítico

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média (DPM). A comparação dos grupos experimentais foi feita com análise de variância (ANOVA) de uma via, com teste de comparação de Student-Newman-Keuls (SNK). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando os valores de probabilidade eram iguais ou menores que 0,05. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Stat versão 2.0 compatível com Windows.

4. ARTIGO DESENVOLVIDO

Effects of hyper- and hypo-osmotic stress, *in vitro*, on protein synthesis, protein mobilization, amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulatus*

Carmen Liane Bock, Lucia Mammarella, Luiz Carlos Kucharski, Roselis Silveira Martins Da Silva*

Departamento de Fisiologia, 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 Sarmento Leite, 500
90.050-170 Porto Alegre, RS, Brazil
Fax +55 51 33 16 34 53
E-mail: Roselis@ufrgs.br

Abstract

In crustaceans, the source of amino acids supplying the intracellular pool and the major pathway(s) implicated in the control of this pool are still unclear. Experiments on acute *in vitro* stress were performed find out whether osmotic stress induced changes in the intrinsic capacity of the amino acids pathways metabolism in *C. granulatus* tissues. We measured protein synthesis and mobilization, amino acids uptake and the $^{14}CO_2$ produced from ^{14}C-leucine in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills submitted to acute hyper- or hypo-osmotic stress, *in vitro.*

Protein synthesis control seems to be implicated in the metabolic adjustment of the intracellular amino acid pools in the hepatopancreas, jaw muscle and gills submitted to acute *in vitro* osmotic challenge. On the other hand, during acute hypo-osmotic stress, *in vitro,* the decrease in amino acids uptake via A system carrier and the increase in total ^{14}C-L-leucine oxidation were employed as a mechanism to reduce the intracellular levels of amino acids in posterior and anterior gills, respectively. Increased amino acids uptake and ^{14}C-protein mobilization is not used as mechanism to increment the intracellular amino acid pools in all tissue studies.

Keywords: protein synthesis and mobilization; amino acid uptake and oxidation; hepatopancreas; jaw muscle; anterior and posterior gills; osmotic stress.

1. Introduction

Estuaries are characterized by both the wide spectrum of salinity they may present and the speed with which extensive changes may occur. These environments are among the most demanding and stressful aquatic biotopes. *Chasmagnathus granulatus* is a euryhaline crab that lives in the mesolittoral and supralittoral zones of estuaries along the southern Brazilian coast (Botto and Irigoyen, 1980) where salinity ranges from 0.22 to 34$^{0}/_{00}$ (Turcato, 1990). In its habitat *C. granulatus* is exposed to a great number of environmental challenges such as temperature, photoperiodicity, environmental oxygen partial pressure, food availability and composition and salinity according to the season of the year, all of which may produce changes in metabolic patterns (Turcato, 1990; Kucharski and Da Silva, 1991; Schein et. al., 2005). This crab has hypo-osmotic blood in concentrated media and hyperosmotic blood in diluted media (Mañe-Gazon et al., 1974), with an isosmotic point in external media between 28.5 and 30$^{0}/_{00}$ in winter and summer, respectively (Bromberg, 1992).

In euryhaline crustaceans, it is known that organic solutes participate in the control of intracellular osmoregulation (Gilles and Delpire, 1997; Gilles, 1997), and that amino compounds are involved in the regulation of cellular volume. Crustacean tissues contain a pool of amino acids that is approximately 10 times larger than that of mammal tissues (Gilles, 1987; Huggins and Munday, 1968). During hyperosmotic stress, the levels of free amino acids in tissues increase about two-fold in the crab *Eriocheir sinensis*, when compared with animals acclimatized to fresh water. In the shrimps *Penaeus stylirostris* and in the crabs *Eriocheir japonicus,* the amino acids glycine, proline and alanine levels increase with increasing environmental salinity (Cobb et al., 1975; Abe et al., 1999). The determination of free amino acids in hemolymph of *C. granulatus* maintained at 20$^{0}/_{00}$ salinity revealed the presence of

essential and nonessential amino acids, the most abundant free amino acids being glycine, serine, arginine, alanine, and proline, and during hyperosmotic stress the glycine concentration in the hemolymph decreased 60% (Schein, 1999). However, in some euryhaline species, free amino acids account for only 10-20% of the intracellular osmotic concentration (Gilles, 1983). These species often utilize methylamines in cell volume regulatory responses (Gilles and Delpire, 1997). In *C. granulatus* exposed during 72 h to hyperosmotic stress an increase in the incorporation of [methyl-^{14}C] choline chloride into ^{14}C-glycine-betaïne in the hepatopancreas was found (Jahn, 2001).

Experiments with ^{3}H-glycine and ^{3}H-proline have demonstrated that protein degradation from tissues may be a useful source of free amino acids in the shrimp *Penaeus setiferus* during hyperosmotic stress (Koening, 1981). Tan and Choong (1981) reported a decrease in hemolymph protein content and increased amino acid concentration in muscle tissue, when *M. rosenbergii* was transferred to more concentrated media. The euryhaline crab *Eriocheir sinensis* subjected to hyperosmotic stress reduced the levels of the more concentrated free amino acids in the hemolymph, suggesting an uptake of amino acids from hemolymph to tissues as the underlying mechanism (Gilles, 1977).

In vivo and *in vitro* experiments have demonstrated that reductions or increases in intracellular nitrogenous components during hypo- or hyperosmotic stress may involve lowered or increased biosynthesis or mobilization of energy substrate, efflux or influx of the amino acids from the cell or some combination of these mechanisms (Gilles and Delpire, 1997).

In *C. granulatus,* Oliveira and Da Silva (2000) suggest that the amino acids released from the different tissues during the hypo-osmotic stress could be deaminated in the hepatopancreas, and the carbon chains used as substrates for the gluconeogenesis pathway

(Oliveira and Da Silva, 2000). Furthermore, jaw muscle gluconeogenesis is one of the pathways implicated in the metabolic adjustment of the amino acids during hyper and hypo-osmotic conditions in *C. granulatus*, and the pattern of gluconeogenic response to osmotic stress may be modified by seasonal environmental differences (Schein et al., 2004; 2005). Moreover, the gluconeogenic capacity of [^{14}C]-alanine in *C. granulatus* gills decreased after hypo-osmotic stress (Chittó, 2000). Rosas et al. (2001) demonstrated that phosphoenolpyruvate carboxykinase activity of the *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas was enhanced when the animals were submitted to low salinity. Thus, gluconeogenesis is one of the pathways involved in the adaptive mechanism of acclimation to salinity changes in crustaceans.

In jaw muscle and hepatopancreas from *C. granulatus* exposed to hyperosmotic stress, *in vivo*, the uptake of amino acids and the reduction in ^{14}C-alanine oxidation seem to be implicated in the metabolic adjustment of the intracellular amino acid pools in these tissues (Schein et al., 2005). On the other hand, during the hypo-osmotic stress, *in vivo*, the total ^{14}C-alanine oxidation is not employed as a mechanism to control the intracellular levels of amino acids in the hepatopancreas and jaw muscle (Schein et al., 2005).

In vertebrates, four major amino acid transport systems have been distinguished on the basis of substrate specificity and ion dependence: systems A, ASC, N, and L. Systems A and ASC are both Na^+-dependent, exhibit overlapping substrate specificity and mediate the electrogenic transport mainly of small aliphatic amino acids, whereas Na^+-independent system L performs the electroneutral transport of branched chain and aromatic amino acids. System N is Na^+-dependent and electrogenic and it is specific for glutamine, histidine, and asparagine. The Na^+ enters the cell together with the amino acid and it is then extruded in exchange for K^+ by the electrogenic Na^+/K^+-ATPase. The accumulation of amino acids and

K^+ into the cells leads to cell swelling, which in turn triggers volume regulatory K^+ efflux (Lang et al., 1998; Yao et al., 2000).

Neuroendocrine factors have been shown to affect the concentration of osmolytes in the hemolymph of osmoregulating crustaceans (Mantel, 1985; McNamara et al., 1991; Charmantier et al., 1994). In *Macrobrachium olfersii*, Freire et al. (1995) showed that free amino acid pools in hemolymph are sensitive to modulation by neuroendocrine factors. The authors suggest that free amino acids might not be quantitatively relevant in terms of extracellular osmolarity, however, they are a sensitive indicator of the osmoregulatory processes and their underlying neuroendocrine control (Freire et al., 1995).

In order to obtain more information about the effects of the hyper and hypo-osmotic stress on the amino acid metabolism, we measured the protein synthesis and mobilization, the amino acids uptake and the $^{14}CO_2$ produced from ^{14}C-leucine in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills submitted to hyper- or hypo-osmotic stress, *in vitro*. Experiments on acute *in vitro* stress were performed to find out if the osmotic stress induced changes in the intrinsic capacity of the amino acids pathways metabolism in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills from *C. granulatus.*

2. Material and Methods

2.1. Animals

Male *Chasmagnathus granulatus* crabs weighing from 14 to 17 g 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

Before being used in the experiments, the crabs were maintained for 10 days in a large tank containing fresh running water at a salinity of 20‰, temperature of 25° C, and a natural light/dark cycle. The animals were fed (50 g) with raw meat *ad libitum,* once a day in the late afternoon. After the acclimation period, the jaw muscle, hepatopancreas and anterior and posterior gill samples were obtained from crabs anesthetized by chilling on ice for 5 min. For the *in vitro* experiments, the anterior and posterior gills were removed, and the chittin cuticle was cut up for improved radiolabeled uptake.

Determination of buffer osmolality for *in vitro* stress

After an acclimation period, six male *C. granulatus* crabs per group were submitted to hypo-osmotic (0 mOsm/Kg H_2O) or hyperosmotic (900 mOsm/Kg H_2O) stress during 6 days. The control group was maintained at 470 mOsm/Kg H_2O. After this time, samples of hemolymph (0.1 ml) were taken from the blood sinus of the claws of individual crabs with a syringe treated with potassium oxalate 10%, and the osmolality immediately determined. The

osmolality of each hemolymph sample was determined using a Wescor 5520 vapor pressure osmometer, and the potassium oxalate osmolality was subtracted. The values obtained were: 736 $\pm$ 16.02 mOsm/Kg H_2O to hypo-osmotic stress; 881 $\pm$ 10.81 mOsm/Kg H_2O_2 to hyperosmotic stress; and 777 $\pm$ 51.04 mOsm/Kg H_2O to control group. Thus, the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gill samples were submitted to *in vitro* osmotic stress, incubating in three different buffers containing:

1) Control (770 mOsm/Kg H_2O) 374 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 8.8 mM H_3BO_3, 10 mM HEPES, 0.1 mM phenylmethylsufonyl fluoride (PMSF), pH 7.8.

2) Hypo-osmotic stress (690 mOsm/Kg H_2O) 331 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 8.8 mM H_3BO_3, 10 mM HEPES, 0.1 mM phenylmethylsufonyl fluoride (PMSF), pH 7.8.

3) Hyperosmotic stress (900 mOsm/Kg H_2O) 457 mM NaCl, 10 mM KCl, 25 mM $CaCl_2$, 10 mM $MgCl_2$, 8.8 mM H_3BO_3, 10 mM HEPES, 0.1 mM phenylmethylsufonyl fluoride (PMSF), pH 7.8.

2.3 Protein synthesis and mobilization

For protein synthesis measurement, hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gill fractions (40-100 mg) from the control group were incubated at 25^0C for 60 min with constant shaking in three different incubation buffers (500µl) containing: control 770 mOsm/Kg H_2O; hypo-osmotic stress 690 mOsm/Kg H_2O; hyperosmotic stress 900 mOsm/Kg H_2O equilibrated to pH 7.8 with 5% CO_2: 95% O_2, in the presence of 0.2 µCi L-leucine-U-^{14}C (9.25MBq/mmol, 310 mCi/mmol, Amersham International) and with a final L-leucine

concentration of 5mM. The incubation was performed in a Dubnoff incubator. Schein (1999) showed progressive increase in the incorporation of ^{14}C from L-leucine into ^{14}C–protein for 30-120 min.

Two samples of tissue fractions were obtained for the determination of protein breakdown. The prelabeled protein was obtained after incubation in control buffer (770 mOsm/Kg H_2O) in the presence of 0.2 µCi L-leucine-U-^{14}C and with a final L-leucine concentration of 5mM. The incubations were performed in the above conditions. After the incubation period one sample was used to determine the prelabeled protein in control buffer conditions. The other prelabeled protein sample was immediately transferred to 500µl of the different incubation buffers (hypo-osmotic, hyperosmotic, control) without L-leucine, and incubated for 60 min in a Dubnoff incubator at 25^0C with constant shaking. After this period, the ^{14}C-protein in tissues samples was determined.

After the experimental periods, the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gill fractions were removed, rinsed in cold incubation buffer, blotted with filter paper. The ^{14}C-protein was immediately determined according to Richardson et al. (1997), and the samples were transferred to vials containing toluene-triton (2:1)-PPO-POPOP. Radioactivity was measured in an LKB Wallac scintillation counter. The values were expressed as nmol of ^{14}C-L-leucine incorporated into protein mg^{-1} of protein . h^{-1}.

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

2.4 Amino acid uptake

Hepatopancreas, jaw muscle, and gills fractions (30-50 mg) were incubated (60 min) in the three different buffers: control (770 mOsm/Kg H_2O); hypo-osmotic (690 mOsm/Kg H_2O) and hyperosmotic (900 mOsm/Kg H_2O). The incubations were performed in the above conditions with 0.2μCi [l-^{14}C]-methyl aminoisobutyric acid (^{14}C-MeAIB) (9.25 MBq/mmol, 250 mCi/mmol, Du Pont) or 0.2μCi [l-^{14}C-]-aminoisobutyric acid (^{14}C-AIB) (9.25 MBq/mmol, 250 mCi/mmol, Du Pont). Following the incubation, tissue fractions were rinsed twice in cold incubation buffer for control, hypo- or hyperosmotic stress, and rapidly blotted on filter paper, immediately transferred to screw-cap tubes containing 1 ml distilled water, and alternatively frozen and boiled (three times), according to Schein et al. (2005). Aliquots (100 μl) of this solution and of the incubation medium were transferred to vials containing toluene-triton (2:1)-PPO-POPOP. Radioactivity was measured in an LKB Wallac scintillation counter. The results are expressed as tissue/medium (T/M) rate: dpm/ml tissue fluid divided by dpm/ml incubation medium (mean ± SDM).

2.5 $^{14}CO_2$ production

For the determination of the $^{14}CO_2$ production, according to De Oliveira et al. (2002), the tissue samples (hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills) were incubated in 1 ml of different incubation buffers (control, hypo-and hyperosmotic) pH 7.8, in the presence of 0.2 μCi L-leucine-U-^{14}C (9.25MBq/mmol, 310 mCi/mmol, Amersham International), plus 5 mM L-leucine for 60 min in accordance to Marqueze (2004).

Incubation was stopped by adding 0.2 ml of 50% TCA through the rubber cap. Then 0.2 ml of 2 M NaOH was injected into the central wells to trap $^{14}CO_2$. These were small glass wells situated inside the flasks and above the level of the incubation medium. The sealed

flasks were kept overnight at 25^0C to trap $^{14}CO_2$, after the center well content was transferred to vials and assayed for $^{14}CO_2$ radioactivity in a liquid-scintillation counter (toluene-triton (2:1)-PPO-POPOP). The values of $^{14}CO_2$ production are expressed as µmol $.g^{-1}$ tissue.h^- incubation.

2.6 Statistical analyses

Results are expressed as means $\pm$ SDM. One-way ANOVA was used to compare experimental conditions in the groups: post hoc tests were carried out using Student-Newman-Keuls. The differences between the media were considered significant when the probability values were the same or smaller than 0.05. All tests were performed with Sigma Stat, version 2.0 compatible with Windows.

3. Results

The effects of hypo- and hyperosmotic stress *in vitro* on protein synthesis in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills are shown in Figure 1 A and B.

In control incubation buffer the ^{14}C-protein synthesis was significantly higher ($P<0.05$) in hepatopancreas than in jaw muscle (Fig. 1 A). Nevertheless, the hypo-osmotic stress markedly ($P<0.001$) increased the ^{14}C-L-leucine incorporation into protein in the hepatopancreas and jaw muscle. In contrast, in hyperosmotic stress the ^{14}C-protein synthesis decreased by 80% ($P<0.001$) in the hepatopancreas and 98% ($P<0.05$) in the jaw muscle (Fig. 1 A).

Irrespective of the experimental condition, the protein synthesis in gills was higher ($P<0.01$) than in hepatopancreas and jaw muscle.

Anterior and posterior gills present a similar protein synthesis capacity in control buffer (Fig. 1 B). Incubation of the anterior gills in hypo-osmotic buffer attained values that were 44% higher than in the control group, although no statistical difference ($P>0.05$) was detected between the control and hypo-osmotic groups. However, incubation of the posterior gills in hypo-osmotic buffer increased the incorporation of ^{14}C-L-leucine into ^{14}C-protein by 70% ($P<0.01$) (Fig. 1 B).

In anterior and posterior gills exposed to hyperosmotic stress, the ^{14}C-L-leucine incorporation into ^{14}C-protein decreased and attained values twice ($P<0.01$) as low as in the control group (Fig. 1 B).

After incubation of the hepatopancreas and posterior and anterior gills for 60 min in control, hypo- or hyperosmotic buffers without L-leucine, the prelabeled proteins were not mobilized significantly ($P>0.05$) as compared to the control group (Fig. 2 A and B). However,

in jaw muscle, the prelabeled protein was mobilized significantly ($P<0.05$) after 60 min of incubation in control, hypo-and hyperosmotic without L-leucine buffers, nevertheless, no significant differences were detected between the different experimental groups (Fig. 2 A).

Hepatopancreas and jaw muscle present a similar ^{14}C-MeAIB uptake capacity in control buffer. The hypo-and hyperosmotic stress, *in vitro*, did not significantly affect the ^{14}C-MeAIB uptake by the hepatopancreas and jaw muscle (Fig. 3 A).

No significant difference in the ^{14}C-MeAIB uptake between the anterior and posterior gills was found (Fig. 3 B). However, 60 min of hypo-osmotic stress decreased the ^{14}C-MeAIB uptake by posterior gills by 40% ($P<0.05$) while in anterior gills the T/M ratio did not differ significantly from that in the control group (Fig. 3 B). Meanwhile, the incubation of the anterior gills in hyperosmotic buffer decreased the ^{14}C-MeAIB uptake 29% ($P<0.05$) (Fig. 3 B). However, the *in vitro* hyperosmotic stress did not significantly affect the ^{14}C-MeAIB uptake by posterior gills (Fig. 3 B).

The ^{14}C-AIB uptake was significantly higher ($P<0.05$) in the hepatopancreas than in jaw muscle, and anterior and posterior gills when incubated in control buffer (Fig. 4 A). The hypo- and hyperosmotic stress *in vitro* did not affect significantly the ^{14}C-AIB uptake in jaw muscle and hepatopancreas (Fig. 4 A). Anterior and posterior gills present a similar ^{14}C-AIB uptake after incubation in control buffer (Fig. 4 B). Likewise, the incubation of anterior and posterior gills into hypo- and hyperosmotic buffers did not affect significantly the ^{14}C-AIB uptake in these tissues (Fig. 4 B).

The total oxidation of ^{14}C-L-leucine to $^{14}CO_2$ was similar in jaw muscle and hepatopancreas incubated in control buffers (Fig. 5 A). The hypo-and hyperosmotic stress *in vitro* did not affect significantly the oxidation of ^{14}C-L-leucine to $^{14}CO_2$ in hepatopancreas. Nevertheless, in jaw muscle the *in vitro* hypo-and hyperosmotic stress increased the oxidation

of ^{14}C-L-leucine to $^{14}CO_2$ by 82% as compared to control, although no statistical differences ($P>0.05$) were detected between the different experimental groups (Fig. 5 A).

The oxidation of ^{14}C-L-leucine to $^{14}CO_2$ in the control buffer was significantly ($P<0.01$) higher in posterior gills than in anterior gills (Fig. 5 B). The hypo-osmotic stress increased the oxidation of ^{14}C-L-leucine to $^{14}CO_2$ in anterior gills by 48%, however, it did not affect the $^{14}CO_2$ production in posterior gills (Fig. 5 B). On the other hand, the hyperosmotic stress did not affect the $^{14}CO_2$ production in both anterior and posterior gills (Fig. 5 B).

4. Discussion

The present study clearly shows that acute osmotic stress, *in vitro*, induced changes in the intrinsic capacity of the amino acid pathways metabolism in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills from *C. granulatus.* According to currents views, the primary triggering signal (s) to control the metabolic pathways could be variations in intracellular levels of inorganic ions or corresponding changes in ionic strength, and/or changes in cell volume occurring in cells subjected to osmotic challenge (Libioulle et al., 2001; Schliess and Häussinger, 2002).

C. granulatus lives in the mesolittoral and the supralittoral zones of estuaries; its natural habitats is characterized by both the wide spectrum of salinity which they may present and the speed at which extensive changes may occur (Turcato, 1990). Changes in amino acids metabolism such as catabolism or *de novo* synthesis may be implicated in the regulation of the intracellular compensatory compounds during osmotic acclimation in the tissues of vertebrates and invertebrates (Lang et al., 1998; Gilles, 1997). The results reported here show that hypo-osmotic stress, *in vitro*, induces an increase in the ^{14}C-protein synthesis in the hepatopancreas, jaw muscle and posterior gills. The only exception was the incorporation of ^{14}C-L-leucine into anterior gill proteins, but it should be noted that the ^{14}C-protein in stressed anterior gills averaged 46% of those in the control group and statistical significance was not attained because of the relatively high dispersion of the results. Moreover, irrespective of experimental conditions, ^{14}C-protein synthesis in anterior and posterior gills was higher than in hepatopancreas and jaw muscle. Our results are in agreement with the observation that gill tissue is the most active tissue in terms of protein synthesis in fish and other marine invertebrates, followed by hepatopancreas and muscle (Lyndon and Houlihan, 1998).

In invertebrates, several *in vitro* studies have demonstrated that during hypo-osmotic stress the concentration of amino acids in tissues decreased (Gilles and Delpire, 1997; Gilles, 1997). Also, in crustaceans, exposed to hypo-osmotic stress the gluconeogenesis is one of the pathway involved in the metabolic adjustment of amino acid pools. The intracellular amino acids could be deaminated and the carbon chains used as substrate for the gluconeogenesis pathway in tissues (Oliveira and Da Silva, 2000; Rosas et al., 2001; Schein et. al., 2005). From the present findings, it is concluded that protein synthesis is one of the mechanisms involved in the adjustment of amino acids pool during acute hypo-osmotic stress, *in vitro*, in *C. granulatus* tissues. In vertebrate hepatocytes hypo-osmotic swelling triggers anabolic pathways as protein synthesis (Schliess and Häussinger, 2002). In contrast, in hemocytes from oyster *Crassostrea virginica*, the hypo-osmotic stress, *in vitro*, decreased the rate of protein synthesis and changed the types of protein produced (Tirard et al., 1997). In *C. granulatus* activation of cellular metabolic response that preserves the intracellular osmotic pressure or integrity of cellular macromolecules as the preferential synthesis of special osmotic stress proteins may contribute to protect the cells from hemolymphatic osmotic fluctuations as found in this crab. In yeast, bacteria or mammalian cells the synthesis of a group of general stress proteins is accelerated by osmotic stress (Petronini et al., 1993; Volker et al., 1992; Schliess and Häussinger, 2002). In hemocytes from *C. virginica* oyster the hyper- and hypo-osmotic stress induced expression of a characteristic set of proteins (Tirard et al., 1997).

In euryhaline crustaceans such as *C. granulatus*, it is known that during hyperosmotic stress, the levels of free amino acids in tissues increase when compared with animals acclimated to fresh water, and serve to readjust the osmolarity of the intracellular fluid to that of the extracellular fluid, and thus contribute to volume regulation (Gilles , 1997; Gilles and Delpire, 1997). The intracellular accumulation of osmolytes involves the intracellular

generation of the osmolyte by metabolic reactions (Wehner et al., 2004). The *C. granulatus* tissues submitted to hyperosmotic stress, *in vitro,* decreased protein synthesis in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior and posterior gills. Thus, decreasing the protein synthesis during the hyperosmotic stress, the cells may increase the amino acids intracellular level and contribute to volume regulation. These results agree with the data for *C. virginica* oyster hemocytes where hyperosmotic stress, *in vitro,* decreased the rate of incorporation of amino acids into protein (Tirard et al., 1997). On the other hand, in cells from vertebrates. the hyperosmotic shrinkage increased proteolysis (Schliess and Häussinger, 2002). However, from the present findings it can be concluded that protein mobilization did not involve the control of the intracellular amino acids pool in the different tissues of *C. granulatus* submitted to acute hyperosmotic stress, *in vitro.*

In the present study, ^{14}C-MeAIB was used to identify in jaw muscle, hepatopancreas and anterior and posterior gills the participation of the A system carrier for amino acids transport, which mediates Na^+-coupled cellular uptake of small aliphatic amino acids, in osmotic regulation (Yao et al., 2000). Moreover, the ^{14}C-AIB was employed to distinguish the participation of the L system carrier (facilitated diffusion) for the amino acid transport during the osmotic regulation. The present data show that ^{14}C-MeAIB uptake decreased only in posterior gills submitted to hypo-osmotic stress, whereas it did not change in other tissues exposed to hyper- or hypo-osmotic stress, *in vitro*. The Na^+-dependent amino acid transport mechanisms have been demonstrated in *C. granulatus* and in other crustaceans (Ahearn et al., 1983; 1992; Monteilh-Zoller et al., 1999; Schein et al., 2005). In vertebrates, the adaptation of this system appears to be the early response of cells to hypertonicity (Wehner et al., 2004). Data of many *in vivo* and *in vitro* studies in invertebrates have demonstrated that the increase in intracellular amino acid pools during hyperosmotic stress involves increased amino acid

uptake from the extracellular space (Gilles and Delpire, 1997: Gilles, 1997; Deaton, 2001; Hosoi et al., 2003). Recently, in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, under hyper-salinity stress, an accumulation of D and L-alanine was demonstrated in both muscle and hepatopancreas (Fujimori and Abe, 2002). In vertebrate tissues different factors affect the transport of amino acids via system A (Yao et al., 2000). Insulin is one of the factors that increase the amino acids transport via system A carrier. In this study the tissues from the control animals were submitted to acute hyperosmotic stress *in vitro*, without previous hormonal stimulation as occurred when the animal was exposed to osmotic stress *in vivo*. Supporting this hypothesis, previous study in *C. granulatus* submitted to hyperosmotic stress, *in vivo*, showed an increase in ^{14}C-MeAIB uptake in jaw muscle and hepatopancreas after 24 and 144 h of stress (Schein et al., 2005). The *in vivo* and *in vitro* studies in *C. granulatus* have shown the presence of insulin-like receptors in gills and the effect of this hormone on the [^{14}C]deoxy-D-glucose uptake in this organ (Kucharski et al., 1997; 2002). Hence, it is possible that the increase in intracellular amino acid pools by decrease in the protein synthesis is the main strategy to adapt to acute hyperosmotic stress, *in vitro*. Supporting this presumption the ^{14}C-AIB uptake (L system) did not change during *in vitro* hyperosmotic stress in all tissue studies. Moreover, the extracellular osmolality, a major regulator of system A, did not increase the ^{14}C-MeAIB uptake in the different tissue studies, however, it decreased the ^{14}C-MeAIB uptake in posterior gills exposed to hypo-osmotic conditions. According to Gilles (1997) the different mechanisms implicated in the control of compensatory solutes depend on the conditions of the cells. Furthermore, the mechanisms involved were intrinsic for a given tissue. The anterior and posterior gills possess different functions, because the posterior gills present an ion transport-type epithelium and the anterior

gills show a respiratory-type epithelium (Genovese et al., 2000; Luquet et al., 2002), and seem to use different strategies to control the amino acids level.

Changes in the amino acid metabolism such as total oxidation to CO_2 can be implicated in the regulation of the intracellular compensatory compounds during osmotic acclimation in the tissues of vertebrates and invertebrates (Lang et al., 1998; Gilles, 1997). In the control group oxidation of ^{14}C-L-leucine in posterior gills was markedly higher than in the hepatopancreas, jaw muscle and anterior gills. In recent studies with posterior gills, the active transbranchial absorption and secretion of Na^+ have been directly demonstrated (Luquet et al., 2002; Onken et al., 2003). The high amino acid oxidation to CO_2 may be one of the pathways supplying energy for the active ion transport in this organ.

The total oxidation of amino acids does not seem to be one of the pathways implicated in the decrease of amino acid pools during hypo-osmotic stress, *in vitro*, in the hepatopancreas, jaw muscle and posterior gills of *C. granulatus.* This is in agreement with the *in vivo* studies in which no increase is found in the total oxidation of amino acids in hepatopancreas and jaw muscle (Schein et al., 2005). The only exception was the increase of the total oxidation of ^{14}C-L-leucine to $^{14}CO_2$ in the anterior gills. On the other hand, Schein et. al. (2005) found a reduction of amino acid total oxidation in the hepatopancreas and jaw muscle from *C. granulatus* submitted to hyperosmotic stress *in vivo*. In other invertebrates under hyperosmotic conditions, decrease in catabolic activity can play a significant role in intracellular increase in amino acid pools (Gilles, 1997). However, the data from this study show that in tissues exposed to acute hyperosmotic stress, *in vitro*, the decrease in the total ^{14}C-L-leucine oxidation was not involved in the intracellular adjustment of amino acid pools in the *C. granulatus* tissues studies. Nevertheless, other amino acids, such as ^{14}C-glutamate,

need to be tested for oxidation to $^{14}CO_2$ under hyper- and hypo-osmotic conditions *in vitro* and at different stress times to confirm these findings.

In conclusion, the control of protein synthesis seems to be implicated in the metabolic adjustment of the intracellular amino acid pools in the hepatopancreas, jaw muscle and gills submitted to acute *in vitro* osmotic challenge. On the other hand, during acute hypo-osmotic stress, *in vitro*, the decrease in amino acids uptake via A system carrier and the increase in total ^{14}C-L-leucine oxidation were employed as a mechanism to reduce the intracellular levels of amino acids in posterior and anterior gills, respectively. The increase in amino acids uptake and ^{14}C-protein mobilization is not used as a mechanism to increment the intracellular amino acid pools in all tissue studies.

Acknowledgments

The experiments were performed in compliance with the current Brazilian laws. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) Brazil. R.S.M.S. is a CNPq fellow.

References

Abe H., Okuma E., Amano H., Noda H., Watanabe K., 1999. Effects of seawater acclimatation on the levels of free D- and L-alanine and other osmolytes in the Japanese mitten crab *Eriocheir japonicus*. Fisheries Sci 65, 949-954.

Ahearn, G.A, Mohckton, E.A, Henry, A.E., Botfield, M.E., 1983. Alanine transport by lobster hepato pancreatic cell-suspension. Am J Physiol 244, R150 – R162.

Ahearn, G.A., Gerencser, G.A, Thamotharan, M., Behnke, R.D., Lemme, T.H., 1992. Invertebrate gut diverticula are nutrient absorptive organs. Am J Physiol 263, R472-R481.

Bikhazi, A. B. cols.,1985. Trans-cellular mechanisms of amino-acid uptake by distal rat ileum insitu. Comp Biochem Phys A-Physiology 80 (1), 5-9.

Botto, J.L. and Irigoyen, H.P., 1980. Biecología de la comunidad del cangrejal contribuición al conocimento biológico del cangrejo de estuario, Chasmagnathus granulata Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur. UNESCO, Montevideo, Uruguay, pp 161-169.

Bradford M.,1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanties of protein utilizing the principle of protein - Dye binding. Anal Biochem 72, 248 - 254.

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. Master thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Charmantier – Dauers M., Charmantier G., Janssen K.P.C., Aiken D.E., Van Herp F. 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster *Homarus americanus*. Gen Comp Endocr 94, 281-293.

Chittó, A.L., 2000. Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. Porto Alegre, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Cobb B.F., Conte F.S., Edwards M.A., 1975. Free amino acids and osmoregulation in *Penaeid shrimp*. J Agric Food Chem 23, 1172-1174.

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., 2002. Ontogenetic Study of the Effects of Energetic Nutrients on Amino acid metabolism of rat cerebral cortex. Neurochem Res 27 (6), 513-518.

Deaton, L.E., 2001. Hyperosmotic volume regulation in the gills of the ribbed mussel, *Geukensia demissa*: rapid acumulation of betaine and alanine. J Exp Mar Biol Ecol 260, 185-197.

Drach, F., and Tchernigovtzeff, C.,1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. Vie Milieu, 161, 595-607.

Freire C.A., McNamara J.C., Rosa J.C., Greene L.J., 1995. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (WIEGMANN) (Crustacea, Decapoda): free amino-acid-concentrations in the hemolymph. Gen Comp Endocr 100, 83-91.

Fujimori, T. and Abe, H., 2002. Physiological roles of free D- and L-alanine in the crayfish *Procambarus clarkii* with special reference to osmotic and anoxic stress responses. Comp Biochem Phys, A 131, 893-900.

Genovese, G., Luquet, C.M., Paz, D.A, Rosa, G.A and Pellerano, G.N., 2000. The morphometric changes in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* under hyper- and hypo-regulation conditions are not caused by proliferation of specialized cells. J Anat 197, 239-246.

Gilles, R., 1977. Effects of osmotic stress on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. Comp Bioch Phys 56 A, 109-114

Gilles, R., 1987 Volume regulation in cells of euryhaline invertebrates. In: Gilles R, Kleinzeller A, Bolis L (eds) Current topics in membranes and transport. Academic Press, New York, pp 205-247.

Gilles, R. 1983. Review: Volume maintenance and regulation in animal cells: some features and trends. Mol Physiol, 4, 3-16.

Gilles, R., 1997. Volume regulation in cells of eucaryhaline invertebrates. In: Gilles, R., Kleinzeller, A. Bolis, L. (Eds.), Current Topics in Membranes and Transport. Academic Press, new York, pp. 205-247.

Gilles, R., and Delpire, E., 1997. Variations in salinity, osmolarity and water availability: Vertabrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed.). Handbook of Comparative Physiology. Oxford University Press, New York,. p. 1523-1586.

Hosoi, M., Kubota, S., Toyohara, H., Hayashi, I., 2003. Effect of salinity change on free amino acid content in Pacific oyster. Fisheries Sci 69, 395-400.

Huggins, A.K and Munday, K.A., 1968. Crustacean metabolism. Adv Comp Physiol Bio, 3, 271-376.

Jahn, M.P., 2001. Efeito osmoprotetor da colina nas brânquias e hepatopâncreas do caranguejo *Chasmagnatus granulata* (Decapoda; Grapsidae) submetido ao estresse osmótico. Dissertação de Bacharelado. UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Koening, M.L., 1981. Aspects of glycine metabolism in juvenile white shrimp (Penaeus setiferus) acutely exposed to hypersaline conditions. Texas A & M University, 1981. M.S. Thesis.

Kucharski, L.C.R. and Da Silva, R.S.M., 1991. Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp Biochem Phys 100 A (3), 599-602.

Kucharski L.C., Ribeiro MF, Schein V, et al. 1997. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata.* J Exp Biol 279 (2), 118-125

Kucharski, L.C., Schein, V., Capp, E., 2002. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Gen Comp Endocr 125 (2), 256-263.

Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Volki, H., Waldegger, S., Gulbins, E. and Häussinger, D., 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Phys Rev 78, 247-306.

Libioulle, C., Corbesier, L., Gilles, R., 2001. Changes in major intracellular osmolytes in L-929 cells following rapid and slow application of hyperosmotic media. Comp Biochem Phys A 13, 461-470.

Lyndon, A.R. and Haulihan, D.F., 1998. Gill Protein Turnover: Costs of Adaptation. Comp Biochem Phys, A 119, 27-34.

Luquet, C.M., Postel, U., Halperin, J., Urcola, M.R., Marques, R. and Siebers, D., 2002. Transepithelial potential differences and Na^+ flux in isolated perfused gills of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Grapsidae) acclimated to hyper- and hypo-salinity. J Exp Biol 205, 71-77.

Mañe-Gazon F., Dei-Cas E., Spector B.H., Leymonte J., 1974. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuario Chasmagnathus granulata Dana, 1851. I. Osmoregulación frnte a cambios de salinidad. Physis-Seccion A 33, 163-171.

Mantel, L.H., 1985. Neurohormonal integration of osmotic and ionic regulation. Am Zool 25, 253-263

Marqueze, A., 2004. Efeito da anoxia e da recuperação sobre a via glicolítica em caranguejos Chasmagnathus granulata mantidos com uma dieta rica em carboidratos ou proteínas. Doctoral thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

McNamara J.C., Salomão L.C., Ribeiro E.A., 1991. Neuroendocrine mediation of hemolymph osmotic and ionic concentrations in the freshwater shrimp Macrobrachium olfersii (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda) during acute salinity exposure. Gen Comp Endocr 84, 16-26.

Monteith-Zoller, M.K., Zonno, V., Storelli, C. Ahearn, G. A, 1999. Effects of zinc on L-[H-3] proline uptake by lobster (Homarus americanus) hepatopancreatic brush-border membrane vesicles. J Exp Biol 202, 3003-3010.

Oliveira, G.T. and Da Silva, R.S.M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in Chamagnathus granulata crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp Biochem Phys 127 B, 375-381.

Onken, H., Tresguerres, M., and Luquet, C.M., 2003. Active NaCl absortion across posterior gills of hyperosmoregulating Chasmagnathus granulatus. J Exp Biol 206, 1017-1023.

Petronini, P.G., Alfieri, R., De Angelis, E., Campanini, C., Borghetti, A.F., Wheeler, K.P. 1993. Different HSP70 expression and cell survival during adaptive responses of 3T3 and transformed 3T3 cells to osmotic stress. Brit J Cancer 67, 493-499.

Richardson, N.A., Andreson, A.J.; and 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., Le Priol, Y., Pascual, C., Rossignyol, J., Contreras, F., Sanchez, A., and Van Wormhoudt, A., 2001. Metabolism and growth of juveniles of Litopenaeus vannamei: effect of salinity and dietary carbohydrate levels. J Exp Mar Biol Ecol 259, 1-22.

Schein, V., 1999. 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. Master thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Schein V., Waché Y., Etges R., Kucharski L.C.R., van Wormhoudt A., and Da Silva R.S.M. 2004. Effect o f hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. Febs Lett 561, 202-206.

Schein, V., Chittó, A. L., Etges, R., Kucharski, L. C., Wormhoudt, A.V., and Da Silva, R. S. M. 2005. Effect of hyper-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. Comp Biochem Phys, Part B 140, 561-567.

Schliess, F. and Häussinger, D., 2002. The Cellular Hydration State: A Critical Determinant for Cell Death and Survival. Biol Chem 383, 577-583.

Tan C.H., Choong K.Y., 1981. Effect of hyperosmotic stress on haemolymph protein, muscle ninhydrin-positive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Comp Biochem Phys A 70, 485-489.

Tirard, C.T., Grossfeld, R.M.,Levine, J.F., and Kennedy-Stoskopf, S., 1997. Effect of Osmotic Shock on Protein Synthesis of Oyster Hemocytes In Vitro. Comp Biochem Phys 116A, n° 1: 43-49.

Turcato, G. S. 1990. Estudo bioecológico do carangueijo do estuário *Chasmagnatus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Volker, U., Mach, H., Schmid, R., Hecker, M., 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in Bacillus subtilis. J Gen Microbiol 138, 2125-2135.

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H. Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H., 2004. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction Rev Physiol Bioch P 148, 1-80.

Yao, D., Mackenzie, B., Ming, H., Varoqui, H., Heeming, Z., Hedigers, M.A., Erickson, D., 2000. A novel system A isoform mediating Na^+/neutral amino acid cotransport. J Biol Chem 28, 22790-22797.

Figures and Legends

Figure 1. Effects of hypo - or hyperosmotic stress, *in vitro*, on the protein synthesis in hepatopancreas and jaw muscle (A), and anterior and posterior gills (B). Data are given as mean $\pm$ SDM, n = 4 - 8 animals in each case. *, statistically significant difference for P<0.05 when compared with control. #, statistically significant difference (P<0.05) between control groups.

Figure 2. Effects of hypo - or hyperosmotic stress, *in vitro*, on the protein mobilization in hepatopancreas and jaw muscle (A), and anterior and posterior gills (B). Data are given as representing mean $\pm$ SDM, n = 4 – 9 animals in each case. *, statistically significant difference for P<0.05 when compared with control. #, statistically significant difference (P<0.05).between control groups

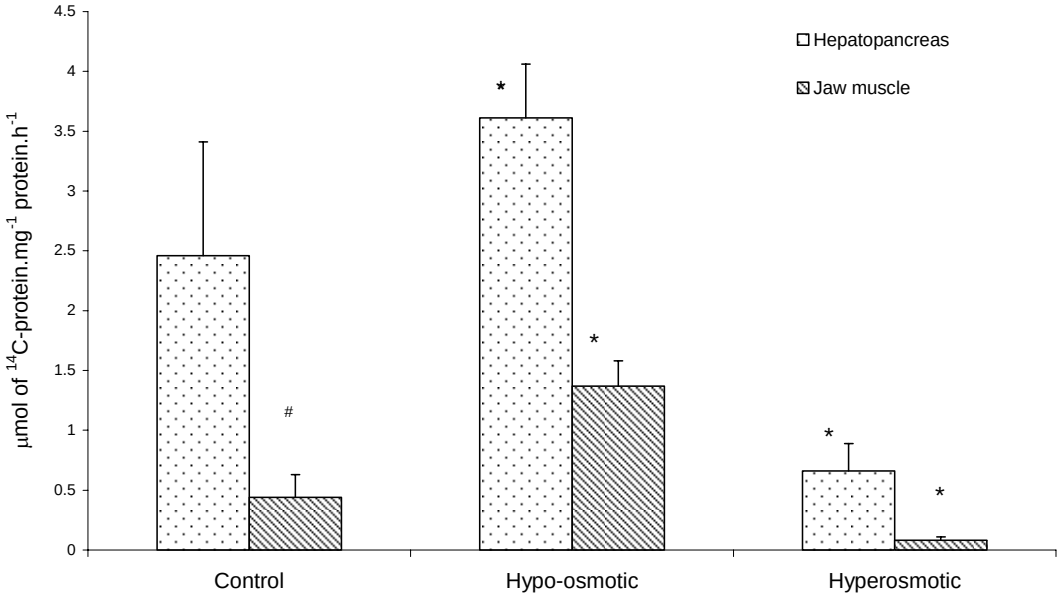
Figure 3. Effects of hypo – or hyperosmotic stress, *in vitro*, on the uptake of [^{14}C]-MeAIB in hepatopancreas and jaw muscle (A), and anterior and posterior gills (B). Values represent mean $\pm$ SDM, n = 7 – 9 animals in each case. *, statistically significant difference for P<0.05 when compared with control.

Figure 4. Effects of hypo – or hyperosmotic stress, *in vitro*, on the uptake of [^{14}C]-AIB in hepatopancreas and jaw muscle (A), and anterior and posterior gills (B). Values represent mean $\pm$ SDM, n = 7 – 9 animals in each case. #, statistically significant difference between control groups (P<0.05).

Figure 5. Effects of hypo – or hyperosmotic stress, *in vitro*, on the [^{14}C]-leucine oxidation to [$^{14}CO_2$] in hepatopancreas and jaw muscle. Values represent mean $\pm$ SDM, n = 4 – 6 animals in each case. *, statistically significant difference for P<0.05 when compared with control. #, statistically significant difference between control groups (P<0.05).

Figure 1

A


4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
µmol of 14C-protein.mg-1 protein.h-1
Hepatopancreas
Jaw muscle
*
*
#
*
*
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

B

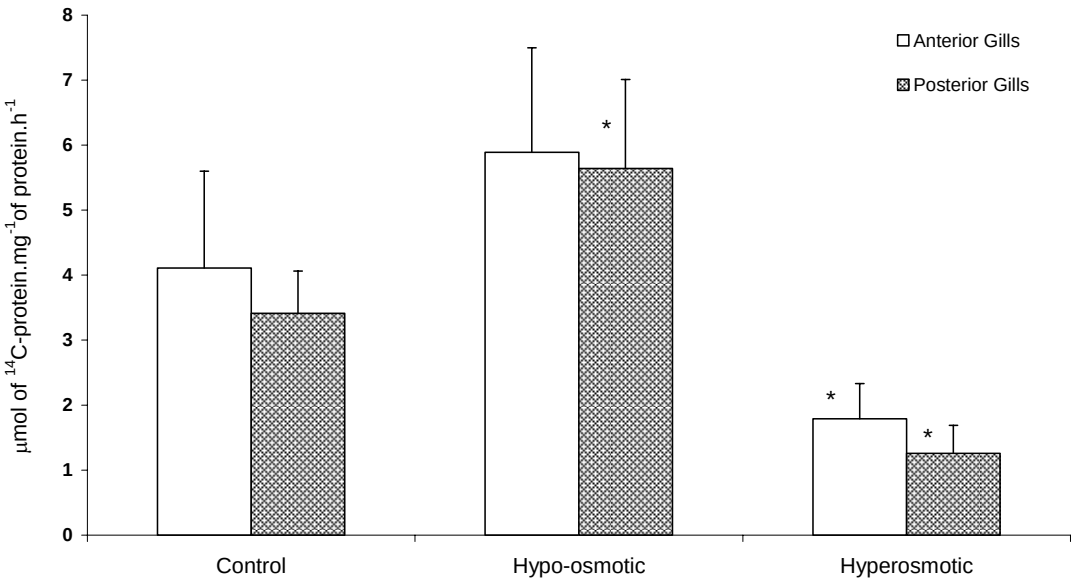
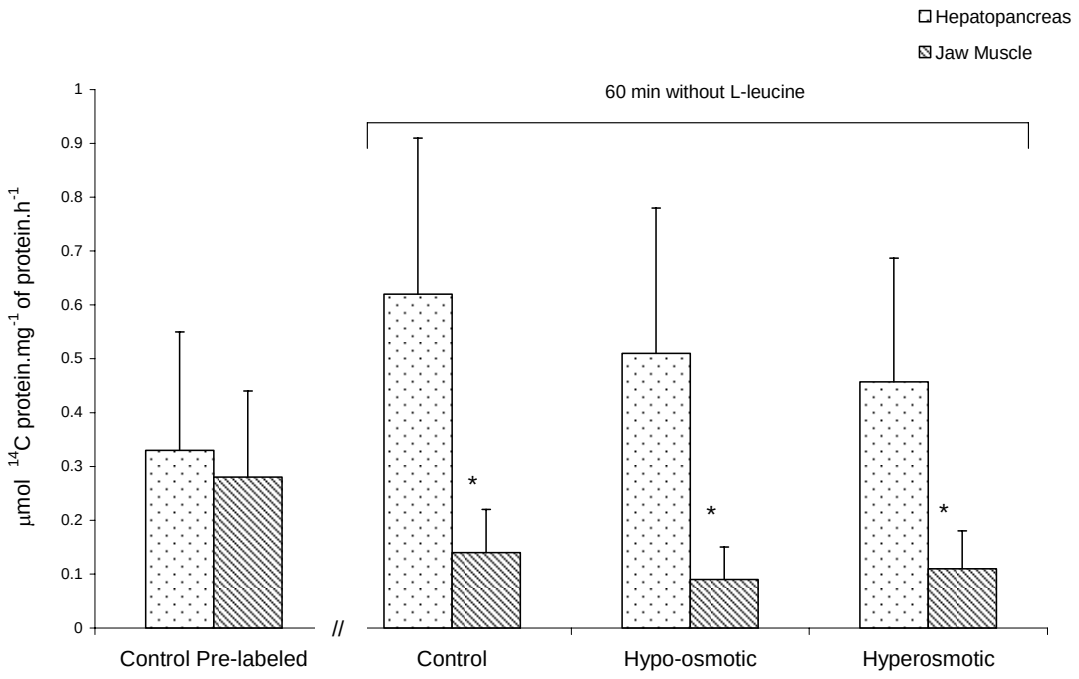

8
7
6
5
4
3
2
1
0
µmol of 14C-protein.mg-1of protein.h-1
Anterior Gills
Posterior Gills
*
*
*
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

Figure 2

A


Hepatopancreas
Jaw Muscle
60 min without L-leucine
µmol 14C protein.mg-1 of protein.h-1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
*
*
//
Control Pre-labeled
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

B

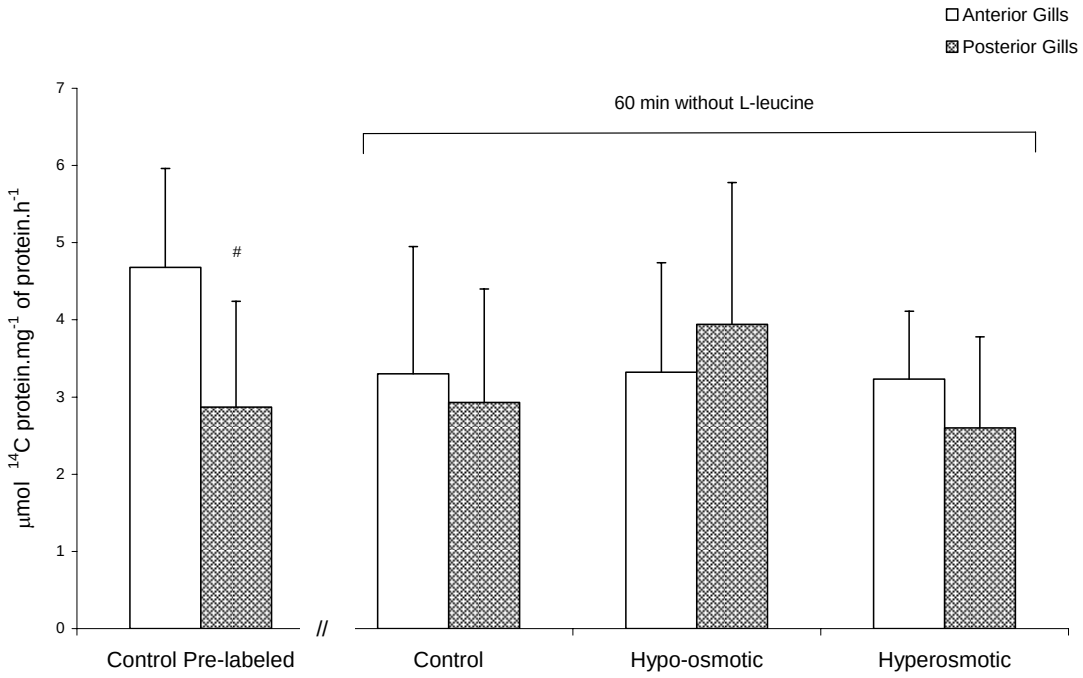
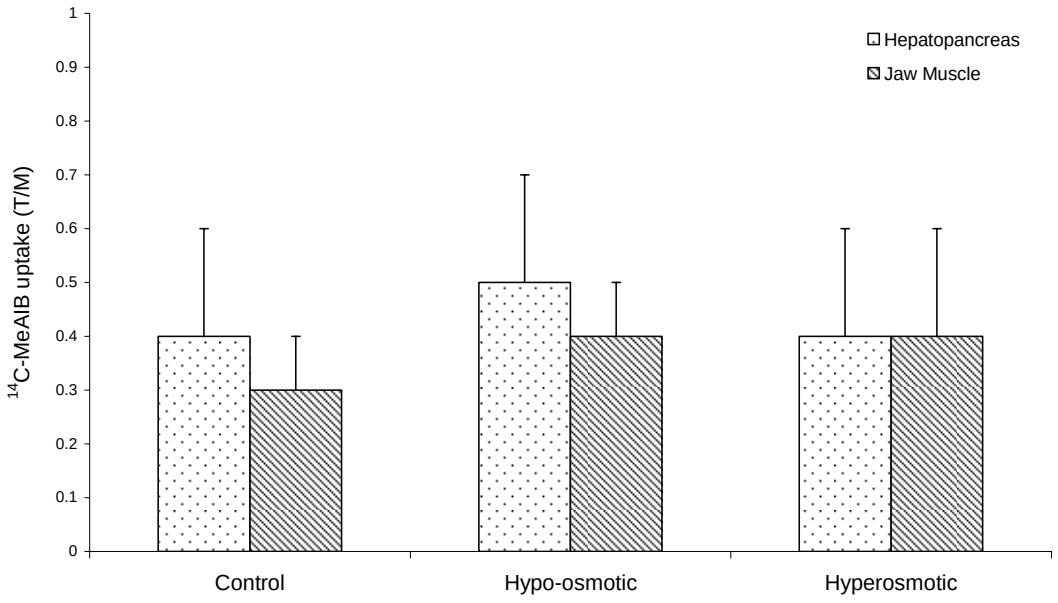

Anterior Gills
Posterior Gills
60 min without L-leucine
µmol 14C protein.mg-1 of protein.h-1
7
6
5
4
3
2
1
0
#
//
Control Pre-labeled
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

Figure 3

A


Hepatopancreas
Jaw Muscle
^{14}C-MeAIB uptake (T/M)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

B

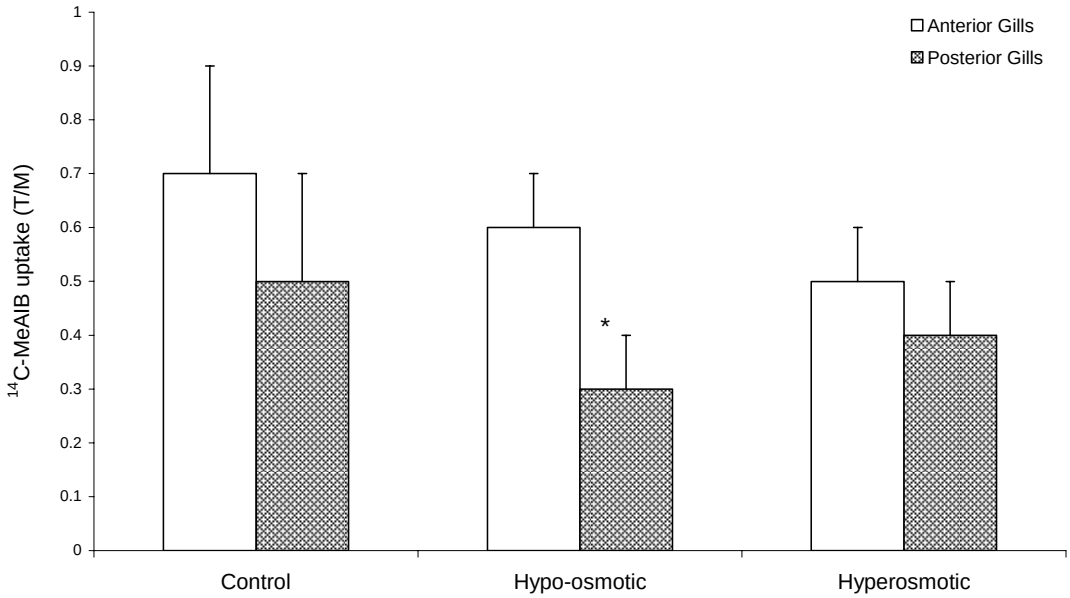
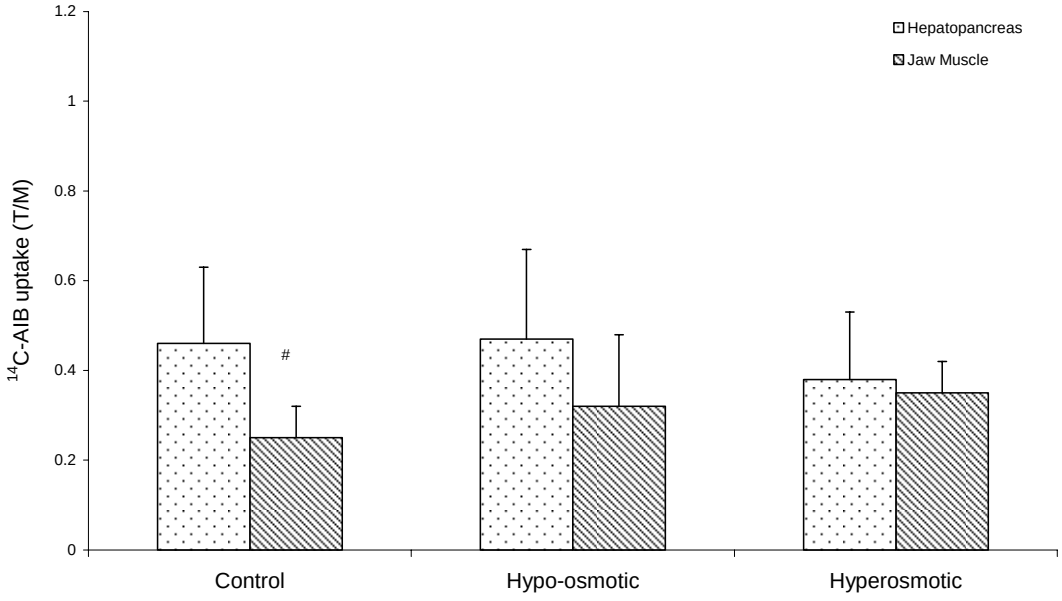

Anterior Gills
Posterior Gills
^{14}C-MeAIB uptake (T/M)
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

Figure 4

A


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
^{14}C-AIB uptake (T/M)
Hepatopancreas
Jaw Muscle
#
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

B

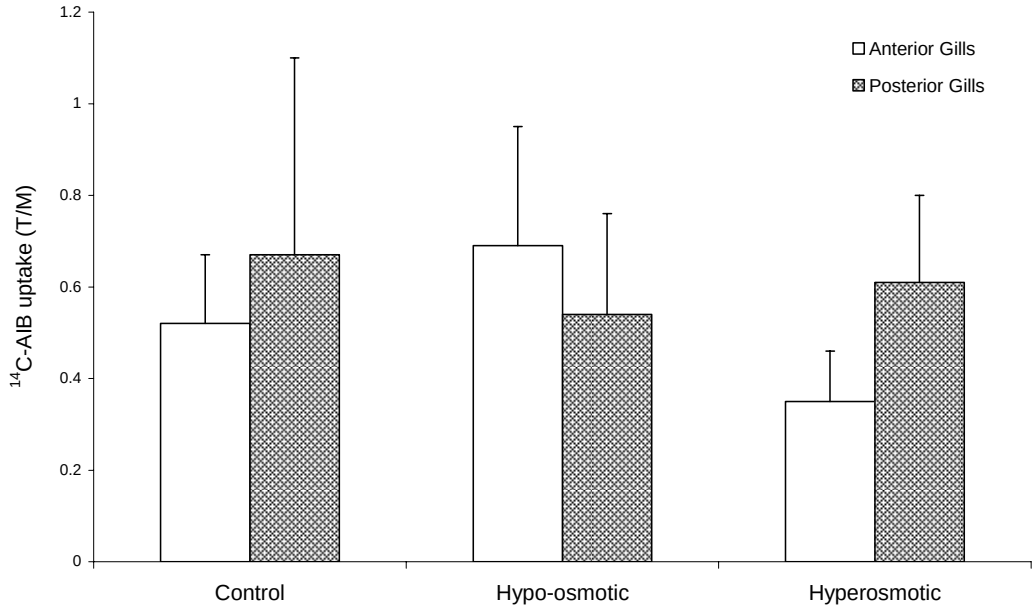
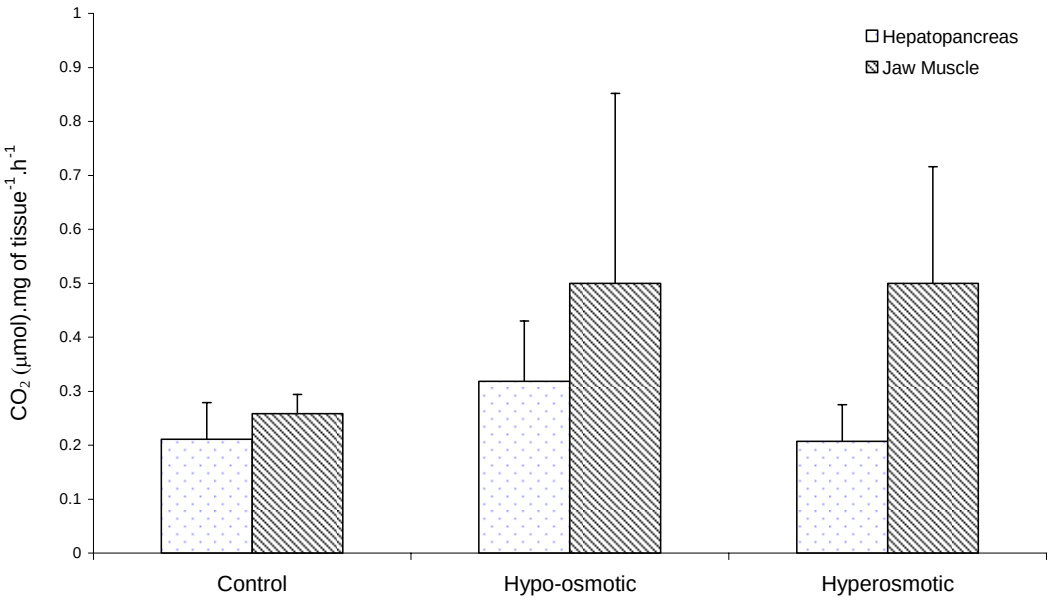
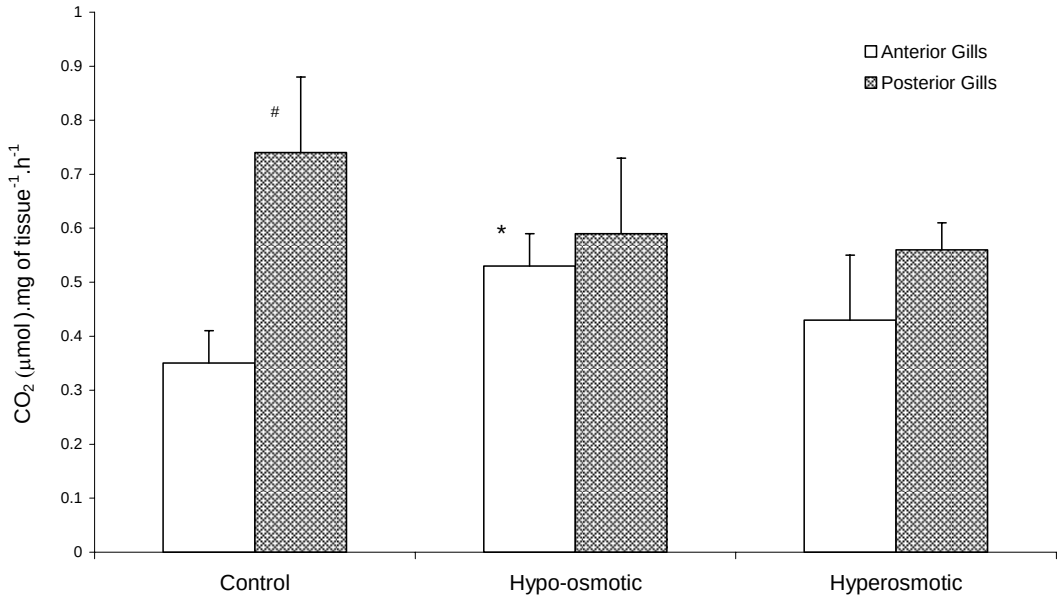

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
^{14}C-AIB uptake (T/M)
Anterior Gills
Posterior Gills
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

Figure 5

A


Hepatopancreas
Jaw Muscle
CO2 (µmol).mg of tissue-1.h-1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

B


Anterior Gills
Posterior Gills
CO2 (µmol).mg of tissue-1.h-1
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
#
*
Control
Hypo-osmotic
Hyperosmotic

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Fatores oceanográficos e meteorológicos, como variações da salinidade, da temperatura, das marés e também da quantidade de O_2 dissolvido na água expõem a biota do ambiente estuarino a um grande estresse (Cooper, 1974; Odum, 1985).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade intrínseca dos tecidos nos estresses hipo ou hiperosmótico, *in vitro*, ou seja, sem a interferência de fatores endócrinos e neuroendócrinos. Sabe-se que o primeiro sinal que controla as rotas metabólicas são variações nas concentrações intracelulares de íons, ou alterações na força iônica, ou ainda alterações no volume de células que estão sendo submetidas a estresse osmótico.

Os resultados deste trabalho demonstram o envolvimento dos aminoácidos no processo de osmorregulação, sendo a síntese e a inibição da síntese de proteínas o efeito marcante do estresse hipo e hiperosmótico, *in vitro*, sobre a concentração intracelular de aminoácidos, em *C. granulatus*. Esse resultado concorda com a afirmação de Wehner (2004), de que a geração intracelular de osmólitos ocorreria por meio da inibição dos processos de síntese.

Em crustáceos, não se conhece a fonte que mantém a concentração intracelular de aminoácidos e, sendo assim seria de grande importância o estudo da (s) proteína (s) que foram sintetizadas durante o estresse hiposmótico, e durante o estresse hiperosmótico tiveram sua síntese reduzida, sendo a biologia molecular a ferramenta indicada para este fim.

Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstram redução ou aumento de compostos nitrogenados intracelulares durante o estresse hipo ou hiperosmótico que envolvem

diminuição ou aumento na biossíntese ou mobilização de substratos energéticos, efluxo ou influxo de aminoácidos da célula ou a combinação destes mecanismos (Gilles e Delpire, 1997).

Mobilizar proteínas sintetizadas a partir de ^{14}C-leucina parece não ser um mecanismo utilizado pelos tecidos estudados. Realizar experimentos de mobilização, porém utilizando um outro aminoácido, ou outros tempos de estresse poderia contribuir na elucidação dos processos de osmorregulação em *C. granulatus*.

Verificou-se redução na captação do aminoácido ^{14}C-MeAIB no choque hiposmótico, nas brânquias posteriores. No entanto, nos outros tecidos e também nos experimentos de captação realizados com o aminoácido ^{14}C-AIB, nenhum resultado foi significativo.

Experimentos com *C. granulatus* submetidos à estresse hiperosmótico, *in vivo*, mostraram aumento e redução, na captação e oxidação de aminoácidos respectivamente, indicando que, diferentemente da resposta dos tecidos submetidos isoladamente ao estresse *in vitro*, fatores neuroendócrinos são determinantes na regulação das concentrações intracelulares de aminoácidos *in vivo* (Schein, 2003).

A concentração de osmólitos na hemolinfa de crustáceos osmorreguladores é afetada por fatores neuroendócrinos (Charmantier e cols., 1994). Freire e cols. (1995) afirmam que os aminoácidos podem não ser quantitativamente relevantes na determinação da osmolalidade extracelular, entretanto, eles são indicadores sensíveis dos processos osmorregulatórios e formam a base do controle neuroendócrino.

Mordure e cols.(2002), verificaram que as brânquias de caranguejos, expostas ao CHH (Crustacean Hyperglycemic Hormone), exibem locais com alta afinidade para este hormônio e mobilizam glicose .

Como os experimentos deste trabalho foram realizados com o propósito de avaliar a resposta dos tecidos diante dos diferentes estresses *in vitro*, não foi avaliada a participação de fatores endócrinos nos processos osmorregulatórios e, sendo assim, seria de grande importância realizar experimentos de captação do aminoácido ^{14}C-MeAIB na presença do CHH e da insulina a fim de elucidar a participação desses hormônios nos processos osmoregulatórios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bikhazi, A. B. e cols.,1985. Trans-cellular mechanisms of amino-acid uptake by distal rat ileum insitu. Comp Biochem Phys A 80 (1), 5-9.

Bishop, S.H.; Greenwalt, D. E.; Martin, A.K., Paynter, K.T. Ellis, L.L., 1994. Metabolic regulation of proline, glycine and alanine accumulation as intracellular osmolytes in ribbed mussel gill tissue. J Exp Zool 268, 151-161.

Boschi, E. E., 1964. Los crustáceos decápodes brachyura del litoral Bonaerense. Bol Inst Biol Mar (Mar del Plata) 6, 1-76.

Botto, J. L. e Irigoyen, H. P.,1980. Biecología de la comunidad del cangrejal contribuición al conocimento biológico del cangrejo de estuario, Chasmagnathus granulata Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) en la desembocadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. Sem. Latinoam. Ecol. Bentonica y Sedimentol. Plataf. Cont. Atlant. Sur. UNESCO, Montevideo, Uruguay, pp 161-169.

Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quanties of protein utilizing the principle of protein - Dye binding. Anal Biochem 72, 248 - 254.

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. Master thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Chang, E.; O'Connors, J.D., 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss, D.E. (Ed.), The Biology of Crustacea. Academic Press, New York. pp 263-289.

Charmantier – Dauers M., Charmantier G., Janssen K.P.C., Aiken D.E., Van Herp F. 1994. Involvement of eyestalk factors in the neuroendocrine control of osmoregulation in adult American lobster Homarus americanus. Gen Comp Endocr 94, 281-293.

Chittó, A.L., 2000. Estudo do metabolismo de carboidratos nas brânquias anteriores e posteriores em caranguejos *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), submetidos ao estresse hiposmótico ou hiperosmótico. Porto Alegre, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

Chung, J.S., Dircksen, H., Webster, S.G., 1999. A Remarkable, Precisely Timed Release Of Hyperglycemic Hormone From Endocrine Cells In The Gut Is Associated With Ecdysis In The Crab *Carcinus Maenas*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (23), 13103-13107.

Cooper A. W., 1974. Salt Marshes. In: Odum, H., Copeland B. J., Macmahan E. A. (eds) Coastal Ecological Sytems of United States. The conservation Fondaition, Washinton D C. V II, 55-98.

Da Silva, R.S.M.; Kucharski, L.C.R., 1992. Effect of Hyposmotic Stress on the Carbohydrate Metabolism of Crabs Maintained on High Protein or Carbohydrate-Rich Diet. Comp Biochem Phys A 101 (3), 631-634.

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., 2002. Ontogenetic Study of the Effects of Energetic Nutrients on Amino acid metabolism of rat cerebral cortex. Neurochem Res 27 (6), 513-518.

Debons, A. F. and Pittmann, J. A., 1962. Stimulation of alpha aminoisobutyric amino-acid 14C uptake in thyroid slices by thyrotropin . Endocrinology 70 (6), 937.

Drach, F., and Tchernigovtzeff, C., 1967. Sur la method de determination des stades d'intermude et son application generale aux crustaces. Vie Milieu, 161, 595-607.

Dragolovich, J, Pierce, SK , 1992. Comparative time courses of inorganic and organic osmolyte accumulation as horseshoe crabs (Limulus-polyphemus) adapt to high salinity. Comp Biochem Phys A 102 (1), 79-8./

Eckhardt, E., Pierrot, C., Thuet, P., Herp, F. V., Daures, M. C., Trilles, J-P and Charmantier, Guy., 1995. Stimulation of osmoregulating processes in the perfused gill of the crab *Pachygrapsus marmoratus* (Crustacea, Decapoda) by a Sinus Gland Peptide. Gen Comp Endocr 99, 169-177.

Eichler, P., 2001. Transporte de glicose e de aminoácidos nas brânquias do caranguejo *Chasmagnathus ganulata* (Dana, 1851. Dissertação de Mestrado, UFRGS (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), Porto Alegre, RS, Brasil.

Freire, C.A., Mcnamara, J.C. e Rosa, J.C. , Greene L.J., 1995. Neuroendocrine control of osmotic regulation in the fresh-water shrimp *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann) (Crustacea, Decapoda). Free amino-acid concentrations in the hemolynph. Gen Comp Endocr 100(1), 83-91.

Gilles, R., 1969. Effects of various salts on the activity of enzimes implicated in amino acid metabolism. Arch Int Physiol Biochem 77, 441-464.

Gilles, R. and Schoffeniels, E., 1969. Isosmotic regulation in isolated surviving nerves of *Eriocheir sinensis* milne edwards. Comp Biochem Phys31 (6), 927-939.

Gilles R., 1977. Effects of osmotic stress on the proteins concentration and pattern of *Eriocheir sinensis* blood. Comp Bioch Phys A 56, 109-114.

Gilles, R., 1982. Osmorregulatory process in mollucs and crustacean from media with flutuating salinity regime. Bol Fisiol Animal USP, 6, 1-36.

Gilles, R., 1983. Review: Volume maintenance and regulation in animal cells: some features and trends. Mol Physiol 4, 3-16.

Gilles, R., 1997. Volume regulation in cells of eucaryhaline invertebrates. In: Gilles, R., Kleinzeller, A. Bolis, L. (Eds.), Curr Top Membr Trans. Academic Press, New York, pp. 205-247.

Gilles, R. e Delpire, E., 1997. Variations in salinity, osmolarity and water availability: vertabrates and invertebrates. In: Dantzeler, W.H. (ed.). Handbook of Comparative Physiology. Oxford University Press, New York,. p. 1523-1586.

Hartnoll, R.G., 1988. Evolution, Systematics and Geographical Distribution. In: Burggren, W. and McMohan, B. Biology of Land Crabs. New York: Cambridge University Press. P. 6-54.

Herreid, C.F., Full, R.J. 1988. Energetics and locomotion. In: Macmahon, B. (ed), Biology of Land Crabs. Cambridge University Press, Cambridge. p.337-377.

Huggins, A.K and Munday, K.A., 1968. Crustacean metabolism. Adv Comp Phys Biochem, 3, 271-376.

Jeuniaux, C. and Florkin, M., 1961. Modification de l'excretion azotee du crabe chinois au cours de l'adaptation osmotique. Arch Int Physiol Biochim 69, 385-386.

Kilberg, M.S., Häussinger, D., 1992. Mammalian aminoacid transport: mechanism and control. Plenun Press. N.Y. pp 3-49.

Koening, M.L., 1981. Aspects of glycine metabolism in juvenile white shrimp (*Penaeus setiferus*) acutely exposed to hypersaline conditions. Texas A & M University. M.S. Thesis.

Kucharski, L. C. R., 1990. Efeito da variação sazonal e de diferentes dietas sobre a concentração de glicose na hemolinfa e de glicogênio e de lipídios totais no hepatopâncreas e no músculo do carangueijo *Chasmagnatus granulata*. Porto Alegre, 1990. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1990.

Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M., 1991a. Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp Biochem Phys A, 100 A (3), 599-602.

Kucharski, L.C.R.; Da Silva, R.S.M., 1991b. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). Comp Biochem Phys A, 99, 215-218.

Kucharski LC, Ribeiro MF, Schein V, et al. 1997. Insulin binding sites in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. J Exp Zool 279 (2), 118-125.

Kucharski, L. C., Capp, E., Citto, A. L. F., 1999. Tyrosine kinase activity in the crab Chasmagnathus granulata gills. J Exp Zool 283 (1), 91-94.

Kucharski, L. C., Schein, V., Capp, E. 2002. In vitro insulin stimulatory effect on glucose uptake and glycogen synthesis in the gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. Gen Comp Endocr 125 (2), 256-263.

Lerner, J., 1985. Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes. Comp Biochem Phys A 81, 713-739.

Mantel, L.H.. e Farmer, L.L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In: Mantel, L.H. The Biology of Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation. Vol.5. Academic Press, New York, p. 53-161.

Martins, H. 2003. Efeito da insulina sobre a atividade da enzima Na^{+}-k^{+} ATPase branquial, a síntese de proteínas e captação de aminoácidos no hepatopâncreas, músculo e brânquias de *Chasmagnathus granulata* (DANA, 1851). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

Matsushima, O; Hayashi, Y.S., 1992. Metabolism of D e L-alanina and regulation of intracelular free amino acids levels during salinity stress in a bracksh-water bivalve *Corbicula japonica*. Comp Biochem Phys 102A, 465-471.

Mordure, A. J.; Webster, S.G. 2002. A-8:chemical communications: from hormones to seiochemicals. Comp Biochem Phys A 132, 63-70

Morris, S.; Airries, C.N., 1998. Integration of physiological responses of crustaceans to environmental challenge. S Afr J Zool 33, 87-106.

Norman, P. S. R. and Mann, G. E., 1988. Secretagogue-induced changes in system-A amino-acid transport in the rat exocrine pancreas – stimulation of 2 –methylaminoisobutyric acid efflux by carbachol. Biochim Biophys Acta 943 (3), 541-546.

Odum E P. Ecologia. (ed), Rio de Janeiro: Interamericana, 1985, 435p.

Okuma, E, Abe, H., 1994. Total D-amino and other free amino acids increase in the muscle of crayfish during seawater acclimatation. Comp Biochem Phys A 109 (1), 191-197.

Oliveira, G. T. e Da Silva, R. S. M., 2000. Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chamagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comp Biochem Phys 127 B, 375-381.

Oliveira, G.T., Rossi, I.C. Da Silva, R.S.M. 2001. Carbohydrate metabolism during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. Mar Biol 139, 335-342.

Oliveira G.T., Eicheler P., Rossi I.C., and Da Silva R.S.M., 2004 a. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate rich diets. J Exp Zool A 301, 240-248.

Oliveira G.T., Rossi I.C., Kucharski L.C.R., and Da Silva R.S.M., 2004 b. Hepatopancreas gluconeogenesis and glycogen content during fasting crabs previously maintained on high-protein or carbohydrate-rich diet. Comp Biochem Phys A 137, 383-390.

Pequeux A, Vallota A. C, Gilles, R., 1979. Blood proteins as related to osmoregulation in crustacea. Comp Biochem Phys A 64 (3), 433-435.

Pierrot, C. S., Soyez, D., Herp, F. V., Gompel, M., Skaret, G., Grousset, E. and Charmantier, G., 2000. Involvement of Crustacean Hyperglycemin Hormone in the Control of Gill Ion Transport in the Crab *Pachygrapsus marmoratus*. Gen Comp Endocr 119, 340-350.

Prosser, C.L., 1973. Water: osmotic; hormonal regulation. In: Prosser, C.L. Comp Anim Phys W.B. Saunders, Philadelphia, p. 1-78.

Richardson, N.A., Andreson, A.J., and 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.

Schein, V. 1999. 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 Porto Alegre, 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999.

Schein, V. 2003. 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* Porto Alegre, 2003. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Schein V, Wache Y, Etges R, Kucharski, L. C., Wormhoudt, A., Da Silva, R.M.S. 2004. Effect of hyperosmotic shock on phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and gluconeogenic activity in the crab muscle. Febs Lett 561 (1-3), 202-206.

Schein V, Chitto ALF, Etges R, Kucharski, L. C., Wormhoudt, Da Silva' R.S.M. 2005a. Effects Of Hypo- Or Hyperosmotic Stress On Gluconeogenesis, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Activity, And Gene Expression In Jaw Muscle Of The Crab *Chasmagnathus Granulata*: Seasonal Differences J Exp Mar Biol Ecol 316 (2), 203-212.

Schein, V., Chittó, A. L., Etges, R., Kucharski, L. C., Wormhoudt, A.V., and Da Silva, R. S. M. 2005b. Effect of hyper-osmotic conditions on neutral amino acid uptake and oxidation in tissues of the crab *Chasmagnathus granulata*. Comp Biochem Phys B 140, 561-567.

Serrano L, Blanvillain G, Soyez, D. 2003. Putative Involvement Of Crustacean Hyperglycemic Hormone Isoforms In The Neuroendocrine Mediation Of Osmoregulation In The Crayfish Astacus Leptodactylus. J Exp Biol 206 (6), 979-988.

Soyez, D., Vanherp, F., Rossier, J., Lecaer, J.P., Tensen, C.P., Lafont, R. 1994. Evidence for a Conformational Polymorphism of Invertebrate Neurohormones - D-Amino-Acid Residue in Crustacean Hyperglycemic Peptides. J Biol Chem 269 (28),8295-18298.

Tan C.H., Choong K.Y. 1981. Effect of hyperosmotic stress on haemolymph protein, muscle ninhydrin-positive substances and free amino acids in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Comp Biochem Phys A 70, 485-489.

Tessari, P. 1994. Effects of insulin on wole-body and regional amino-acid-metabolis. Diabetes Metab Rev 10 (3), 253 – 285.

Trapp, M., Schein, V., Wache, Y, Favrel, P., Capp, E., Kucharski, L.C., Wormhoudt, A. van, Da Silva, R.S.M. 2002. Tyrosine kinase activity of the insulin receptor from *Chasmagnathus granulata* gills and partial cloning of insulin receptor gene. European Comparative Endocrinologists. August 26-36, 2002.

Trapp, M., Kucharski, L. C., 2004. Atividade tirosina quinase do receptor à insulina e captação de 2-deoxi-glicose-^{14}C em brânquias do caranguejo *Chasmagnathus granulata* submetido ao estresse hiperosmótico. FeSBE – Federação de Sociedades de Biologia Experimental – 25 a 28 de agosto de 2004 – Águas de Lindóia – SP –Brasil.

Turcato, G. S. 1990 Estudo bioecológico do carangueijo do estuário *Chasmagnatus granulata* Dana, 1851 (Crustácea, Decapoda, Grapsidae) na Lagoa de Tramandaí, RS, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (Bacharelado em Ciências Biológicas: Zoologia) Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Vinagre, A. S., 1999. Metabolismo de carboidartos no caranguejo Chasmagnathus granulata: efeito do jejum e da realimentação e da apedunculação sobre a adaptação ao estresse hiposmótico. Porto Alegre: UFRGS. Porto Alegre, 1999. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas-Fisiologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

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.

Wehner, F., Olsen, H., Tinel, H. Kinne-Saffran, E., Kinne, R.K.H., 2004. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. Rev Physiol Bioch P 148, 1-80.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo