

Luiz Alves de Brito

**Efeitos de inibidores e da Na^+/K^+ ATPase sobre a tomada
de cálcio em epitélios de troca em caranguejos terrestres**

São Paulo

2007

Luiz Alves de Brito

Efeitos de inibidores e da Na⁺/K⁺ ATPase sobre a tomada de cálcio em epitélios de troca em caranguejos terrestres

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Fisiologia Geral.

Orientador(a): **Prof^ª. Dra. Flávia Pinheiro Zanotto**

São Paulo

2007

Ficha Catalográfica

Brito, Luiz A.

Efeitos de inibidores e da Na^+/K^+
ATPase sobre a tomada de cálcio em
epitélios de troca em caranguejos
terrestres

Número de páginas 81

Dissertação (Mestrado) - Instituto
de Biociências da Universidade de São
Paulo. Departamento de Fisiologia.

1. Cálcio 2. Crustáceos 3.
inibidores

I. Universidade de São Paulo. Instituto
de Biociências. Departamento de
Fisiologia.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Flávia Pinheiro Zanotto
Orientador(a)

Dedicatória

Dedico à minha Família e a todas as pessoas
que realmente desejam o meu sucesso.

Epígrafe

“Nada pode ser considerado totalmente concluído, se não for tentado de todos os modos possíveis”

Philippe Sidney

Agradecimentos

Ao Instituto de Biociências – USP, por possibilitar a extensão da formação acadêmica, além do conhecimento científico adquirido ao longo desses anos;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Flávia Pinheiro Zanotto, pela excelente orientação, pelo apoio e valiosa contribuição na elaboração e execução deste trabalho

Ao Prof Dr José Guilherme de Souza Chauí-Berlink, pelo apoio e auxílio, durante a execução deste trabalho, estando sempre disposto a ajudar e colaborar;

Ao Prof Dr Luis Carlos Salomão, pelos ensinamentos, apoio e auxílio, tanto na graduação, quanto na pós-graduação.

À Liuba (técnica do Laboratório de Engenharia da UPM) pelo apoio e por estar disposta a ajudar;

À Flávia (técnica do Laboratório de Biociências da UPM), pelo auxílio e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho;

À equipe do Laboratório de Fisiologia de Crustáceos do Instituto de Biociências – USP, Felipe, Marina, Bruno, Celso e Renato pela disposição e apoio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de uma bolsa de mestrado e reserva técnica (processo 03/10311-1) na pessoa de seu diretor científico Dr Carlos Henrique de Brito Cruz e pelo apoio científico que permitiu a execução desse projeto.

Aos meus Pais, Luiz Pereira Davini e Maria do Carmo Alves de Brito por minha vida e me ensinar bons valores.

À Cristiane de Oliveira Fernandes Silva, pela paciência, incentivo, auxílio e apoio;

Aos meus verdadeiros amigos, pelos sinceros votos de sucesso;

À Deus, por tudo que têm feito em nossas vidas.

Índice

1.	<i>Abstract/Resumo</i>	1
2.	Introdução	3
2.1.	Níveis de adaptação ao ambiente terrestre	4
2.2.	Regulação osmótica em crustáceos	6
2.3.	Estrutura e função dos tecidos transportadores	7
2.3.1.	Brânquias	7
2.3.2.	Glândula Antenal	9
2.3.3.	Hepatopâncreas	10
2.4.	Regulação iônica em crustáceos em relação ao Ca^{2+}	12
2.5.	Sistemas modelos celulares para o transporte de Ca^{2+} transepitelial	13
2.6.	Influência da Na^+/K^+ ATPase no transporte de Ca^{2+} transepitelial	15
3.	Justificativa	17
4.	Objetivos	18
5.	Material e métodos	19
5.1.	Animais utilizados no estudo	19
5.2.	Manutenção dos animais em laboratório	20
5.3.	Análise da hemolinfa dos animais	21
5.4.	Dispersão das células	22
5.5.	Transporte de Ca^{2+} no fluorímetro	23
5.6.	Dosagem de proteínas totais	24
5.7.	Tratamento estatístico dos dados/ análise dos resultados	25
6.	Resultados	26
6.1.	Experimentos de transporte utilizando brânquias	26
6.1.1.	Experimentos de transporte utilizando brânquias em fase de intermuda	27
6.1.2.	Experimentos de transporte utilizando brânquias em fase de pós-muda	30
6.2.	Experimentos de transporte utilizando hepatopâncreas	33
6.2.1.	Experimentos de transporte utilizando hepatopâncreas em fase de intermuda	34
6.2.2.	Experimentos de transporte utilizando hepatopâncreas em fase de pós-muda	37
6.3.	Experimentos de transporte utilizando glândula antenal	40
6.3.1.	Experimentos de transporte utilizando glândula antenal em fase de intermuda	41

6.3.2.	Experimentos de transporte utilizando glândula antenal em fase de pós-muda	44
6.4.	Resultados obtidos em relação às espécies e os estágios de intermuda e pós-muda	47
7.	Discussão	51
7.1.	Transporte de Ca^{2+} em brânquias	51
7.2.	Transporte de Ca^{2+} em hepatopâncreas	56
7.3.	Transporte de Ca^{2+} em glândula antenal	60
7.4.	Outros fatores que podem influenciar o transporte de Ca^{2+}	64
8.	Conclusão	67
9.	Referências bibliográficas	68
10.	Apêndice A - Análise estatística dos resultados obtidos em relação às espécies e os estágios de intermuda e pós-muda	77

1 – Resumo

A homeostase do cálcio possui um papel central no funcionamento dos tecidos e células animais e torna-se, então, fundamental o entendimento dos mecanismos celulares de transporte de Ca^{2+} transmembrânico, e para isso, os crustáceos têm sido utilizados como modelo de estudo. Caranguejos terrestres e semi-terrestres, devido ao acesso limitado ao meio líquido desenvolveram mecanismos fisiológicos para a conservação de Ca^{2+} (em gastrólitos, hemolinfa e hepatopâncreas), sendo que os crustáceos apresentam quatro tecidos especializados para troca bi-direcional específica de Ca^{2+} : (i) brânquias, (ii) epitélio do sistema digestivo, (iii) glândulas antenais e (iv) a camada da hipoderme da cutícula (não analisado no presente projeto). Nesses tecidos, a entrada de Ca^{2+} através de membranas apicais envolve o trocador de $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$ ($n\text{H}^+$) e um canal de Ca^{2+} ; os trocadores basolaterais, por outro lado, envolvem (i) o trocador de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (ii) uma bomba de Ca^{2+} -ATPase, e (iii) um canal de cálcio inibido por verapamil. Estudou-se aqui a ação conjugada de inibidores (amiloride e verapamil) e a ação indireta da ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ ATPase) sobre a tomada de Ca^{2+} , visando testar a necessidade de um gradiente de Na^+ para o transporte secundário de Ca^{2+} em células isoladas de brânquias, glândulas antenais e hepatopâncreas preparadas a partir de animais em fase de inter-muda e pós-muda. Nos caranguejos utilizados no presente projeto (Superfamília Grapsoidea), os quais apresentam diferentes níveis de terrestrialidade: (A) *Casmagnathus granulatus* T₂, (B) *Sesarma rectum* T₃ e (C) *Goniopsis cruentata* T₃, os inibidores amiloride (12,7 mM), verapamil (40 mM), e amiloride + verapamil conjugados, promoveram tendências à redução no transporte de Ca^{2+} . O uso do inibidor ouabaína (17,1 mM), sugere a necessidade de um gradiente de Na^+ para o transporte secundário de Ca^{2+} . Os resultados obtidos comprovaram também a relação entre o nível de terrestrialidade e as adaptações fisiológicas em relação à homeostase do Ca^{2+} somente em hepatopâncreas, enquanto que a glândula antenal parece não exercer papel relevante na homeostase do Ca^{2+} em caranguejos semi-terrestres.

1 - Abstract

Calcium homeostasis possess a central role on animal cells and tissues and the understanding of transepithelial Ca^{2+} transport mechanisms becomes fundamental, and crustaceans have been used as study model. Since terrestrial and semi-terrestrial crabs have limited access to water, they have evolved physiological mechanisms in order to conserve Ca^{2+} (in gastroliths, hemolymph and hepatopancreas), and crustacean have shown four specialized tissues for specific bidirectional Ca^{2+} exchange: (i) gills, (ii) the gut epithelia, (iii) antennal glands e (iv) the layer of cuticle hypodermis (not analyzed in this project). In these tissues, the apical Ca^{2+} uptake involves a $\text{Ca}^{2+}/\text{nNa}^+$ (nH^+) exchanger and a Ca^{2+} channel; in contrast, basolateral exchangers may involve: (i) a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (ii) a Ca^{2+} ATPase, and (iii) a verapamil-inhibited Ca^{2+} channel. The objective of this project was to study the action of conjugated inhibitors (amiloride and verapamil) and ouabain (Na^+/K^+ ATPase inhibitor) on Ca^{2+} uptake, to show the necessity of a Na^+ gradient for the secondary Ca^{2+} transport in isolated gills, antennal glands and hepatopancreatic cells from intermoult and postmoult animals. The crabs used in this project (Grapsoidae Superfamily), present different levels of terrestrial adaptations: (a) *Casmagnathus granulatus* T₂, (b) *Sesarma rectum* T₃ and (c) *Goniopsis cruentata* T₃. The inhibitors amiloride (12,7 mM), verapamil (40 mM), and amiloride + verapamil used in this project promoted a tendency to reduce Ca^{2+} transport. The results on ouabain inhibitor (17.1 mM) suggests the necessity of a Na^+ gradient for secondary Ca^{2+} transport,. The results also suggest a relationship between level of terrestrial adaptation and physiological responses related to Ca^{2+} homeostasis in hepatopancreas, while the antennal gland does not seem to have a relevant role on Ca^{2+} homeostasis in semi-terrestrial crabs.

2 – Introdução

A homeostase do cálcio (Ca^{2+}) possui um papel central no funcionamento dos tecidos e células animais, envolvendo, por exemplo, o acoplamento da excitação/secreção, a sinalização intracelular e a biomineralização (WHEATLY *et al.*, 2002). Devido à sua importância, torna-se fundamental o entendimento dos mecanismos celulares de transporte de Ca^{2+} transmembrânico. Os crustáceos, por apresentarem ciclo de muda que envolve perda e retirada de cálcio do meio, vêm sendo utilizados como um modelo para o estudo dos mecanismos moleculares e celulares da homeostase de cálcio (WHEATLY, 1996, 1999).

Esses mecanismos de transporte são estudados com mais facilidades em epitélios próprios para o transporte de Ca^{2+} , como por exemplo o sistema digestório, a glândula antenal, as brânquias (em espécies aquáticas) e nos tecidos responsáveis pela biomineralização (ossos/cutículas).

O exoesqueleto dos crustáceos é composto por quitina e principalmente por carbonato de cálcio (CaCO_3), que confere rigidez à carapaça. Devido a esse exoesqueleto, os crustáceos apresentam uma taxa de crescimento descontínua, caracterizada pela muda (ecdise). Para caranguejos aquáticos, o processo de muda é um período de estresse e mortalidade, resultante do perigo inerente do processo de muda em si, e do alto risco de predação enquanto o novo exoesqueleto ainda não enrijeceu (calcificou) e o caranguejo permanece incapaz de se locomover. Para os caranguejos terrestres, há complicações adicionais: o risco de desidratação, que é grande nesse período e, a obtenção de uma quantidade de água necessária para o crescimento durante a pós-muda, que deve ocorrer rapidamente antes do endurecimento do novo exoesqueleto (BURGGREN & MCMAHON, 1988).

O ciclo de muda, segundo BARNES (1986), pode ser dividido nos seguintes estágios:

Intermuda: período intermediário entre as mudas apresentando-se como o período mais longo do ciclo. Embora o exoesqueleto esteja completamente estruturado e com o endurecimento do novo tegumento finalizado, nessa fase, inicia-se o acúmulo de reservas energéticas para a próxima muda. Neste período, a formação dos novos tecidos também é concluída. Durante períodos de rápido crescimento, o período de intermuda é relativamente curto e conhecido como diecdise, já durante períodos de lento crescimento, como durante o inverno, o longo período de intermuda é chamado de aneecdise.

Pré-muda (pró-ecdise): período preparatório para a muda, caracterizada pelo alto acúmulo de reservas alimentares e elevação da concentração de Ca^{2+} na hemolinfa (reabsorção do exoesqueleto e acúmulo de cálcio no hepatopâncreas). Caranguejos terrestres e semi-terrestres, por possuírem acesso limitado ao meio líquido, evoluíram mecanismos fisiológicos para conservação de Ca^{2+} , como o armazenamento em gastrólitos (JENO, 1980). Nesse período um novo tegumento começa a se formar sobre o tegumento antigo, e as reservas energéticas são mobilizadas para permitir a formação de novas estruturas.

Muda (ecdise): neste período o antigo tegumento é trocado, onde enzimas iniciam a ruptura do antigo exoesqueleto (exuvia). Logo após este processo, o corpo do animal incha devido à entrada de água através das brânquias e pelo intestino médio. Ocorre também a dissolução dos gastrólitos localizados no hepatopâncreas e o início da absorção de cálcio da água através das brânquias. Este processo se completa em algumas horas.

Pós-muda (meta-ecdise): período onde o animal calcifica o exoesqueleto (através do cálcio armazenado e da absorção de cálcio pelas brânquias), e à medida que o novo exoesqueleto endurece, elimina água corporal permitindo o crescimento de novos tecidos para acompanhar o crescimento da nova carapaça.

Apesar do processo de muda ser, aparentemente, um processo rápido (e intermitente), ele afeta profundamente todo o ciclo de vida do animal e durante o período entre as mudas, onde ocorrem contínuas mudanças fisiológicas e morfológicas. Essas mudanças permitem que o caranguejo se prepare para a muda, assim como se recuperar dessa fase (HARTNOLL, 1982, 1983).

2.1 – Níveis de adaptação ao ambiente terrestre

O maior problema seria a definição de quais características de comportamento e habitat caracterizam um caranguejo como sendo terrestre. BLISS, em 1986, deu ênfase na dificuldade em discriminar entre os decápodos terrestres, semi-terrestres e aquáticos. Um fator de complicação é a possibilidade das espécies serem altamente especializadas à vida terrestre durante parte do seu ciclo de vida e ainda muito dependente da água em outras fases.

Os níveis de adaptação terrestre implicam no aumento da independência do

ambiente aquático, no entanto podem não se correlacionar com a tolerância à dissecação (BURGREEN & MACMAHON, 1988). Comparados aos insetos, mesmo o caranguejo com o maior nível de adaptação ao ambiente terrestre apresenta pouca resistência à perda de água. A perda de água é minimizada através da permanência em tocas e micro-ambientes úmidos e sendo predominantemente ativos à noite ou com o clima úmido. A absorção de água é mantida principalmente por visitas à água, ingestão ou absorção por capilaridade do substrato (WOLCOTT, 1976). Qualquer caranguejo que passe parte do seu tempo fora da água demonstra um grau de adaptação à terrestrialidade, mas deve ser também considerado o fato de o caranguejo ser ativo quando fora d'água. Isso exclui muitos caranguejos que vivem na região entre marés em tocas, poças, sobre rochas ou enterrados no substrato na maré baixa, os quais somente são ativos durante a maré alta. No entanto, os caranguejos que vivem na região entre-marés e são ativos quando expostos ao ar devem ser incluídos como terrestres (BURGREEN & MACMAHON, 1988).

Cinco níveis de adaptação terrestre, de T₁ a T₅ serão descritas a seguir, mas os limites entre estes não são bem definidos (BURGREEN & MACMAHON, 1988):

Nível T₁ – espécies residentes em água doce ou no mar, ativas na água, mas apresentam atividade intermitente no ar, normalmente por curtos períodos. Exemplos incluem os potamídeos mais aquáticos e alguns grapsídeos como o *Percnon*.

Nível T₂ – espécies residentes na região entre-marés, as quais permanecem escondidas em fendas, sobre rochas ou enterradas quando submersas pela maré. Somente são ativas no ar quando a maré recua, seja durante o dia, noite, ou ambos. Ocypodídeos como *Uca* ou *Dotilla* são exemplos.

Nível T₃ – espécies residentes acima da região entre-marés ou fora da água doce e são ativas no ar (geralmente à noite). Geralmente habitam tocas e necessitam de acesso regular a água na qual podem imergir, seja por visitas ao mar e outras fontes, ou através da água existente no fundo de suas tocas. Dependem da água para os estágios larvais pelágicos. Exemplos são *Cardisoma* e *Ocypode*.

Nível T₄ – espécies como as do nível T₃, mas não necessitam imergir frequentemente na água. Podem obter água a partir do alimento, bebendo orvalho, por capilaridade ou absorção osmótica de substratos úmidos (WOLCOTT, 1976, 1984). Dependem da água para os estágios larvais pelágicos. Exemplos são *Gecarcinus* e *Geograpsus*.

Nível T₅ – espécies como as do nível T₄, mas não necessitam acessar a água para a liberação da larva, uma vez que o seu desenvolvimento é abreviado. Algumas espécies de *Geosesarma* e certos potamonídeos são exemplos e representam o mais alto nível de terrestrialidade.

2.2 – Regulação osmótica em crustáceos

Os crustáceos apresentam inúmeros padrões de regulação osmótica (PROSSER, 1973). Em relação à capacidade de sobreviver em diferentes salinidades, os crustáceos podem ser classificados desde estenoalinos, tolerando apenas pequena variação na salinidade do meio externo, até eurialinos, capazes de tolerar amplas alterações. Os limites de distribuição das espécies nos diferentes ambientes são parcialmente determinados pela sua capacidade de tolerar alterações na salinidade do meio externo. Assim, quanto mais eurialina for uma espécie, maior a sua propensão evolutiva em possuir membros que tenham ocupado e invadido uma variedade de habitats (LEE & BELL, 1999).

Espécies características de ambientes sub-litorais apresentam seus fluidos corporais semelhantes à água do mar em composição e concentração. Elas são relativamente permeáveis a H₂O e aos íons e produzem urina que é isosmótica em relação à hemolinfa (GREENAWAY, 1979; MANTEL & FARMER, 1983). Vale lembrar que a hemolinfa funciona como um tampão contra alterações no volume intracelular.

A relação entre a osmolalidade da hemolinfa e a do meio externo após exposição a uma determinada salinidade é frequentemente expressa em termos de osmoconformidade e de osmorregulação. Nos crustáceos osmoconformadores, a concentração osmótica da hemolinfa segue aquela do meio externo, onde os animais podem resistir a uma diluição limitada do meio, mas não demonstram habilidade de regular a concentração de seus fluidos extracelulares, enquanto nos osmorreguladores a concentração osmótica da hemolinfa é mantida entre certos limites espécie-específicas. Por exemplo, uma espécie pode ser capaz de regular a osmolalidade da sua hemolinfa até uma determinada salinidade, mas tornar-se osmoconformadora após expor-se a salinidades muito diferentes daquela do seu ambiente natural (GREENAWAY, 1979; MANTEL & FARMER, 1983)

Os tecidos epiteliais são altamente especializados, sendo que a superfície apical faceia o meio externo, enquanto a superfície basal faceia o meio interno contendo o fluido extracelular. As células especializadas no transporte iônico ativo são caracterizadas

principalmente por microvilos apicais e invaginações basais associadas a numerosas mitocôndrias, as quais estão relacionadas ao fornecimento de ATP para o funcionamento enzimático (MANTEL & FARMER, 1983; PÉQUEUX, 1995). A perda de sais é repostada pela absorção de íons da água por meio de enzimas transportadoras de íons (ATPases) situadas no epitélio branquial. O excesso de água é removido pelo aumento da taxa de produção de urina, o qual, no entanto se mantém isosmótica com relação a hemolinfa. Esse padrão de osmorregulação é conhecido como regulação hiperosmótica (GREENAWAY, 1979; MANTEL & FARMER, 1983).

2.3 – Estrutura e função dos tecidos transportadores

2.3.1 – Brânquias

A colonização do ambiente terrestre por crustáceos decápodos, do mesmo modo que os vertebrados, necessitou da evolução de novas estruturas que permitissem a absorção eficiente do oxigênio do ar. Em grande parte essa evolução envolveu a expansão da cavidade branquial e a modificação do epitélio branquial, e essas duas modificações aumentaram a superfície de contato para as trocas gasosas. A absorção do oxigênio, no entanto, é uma das complexas funções das brânquias, que incluem a excreção do CO₂, regulação osmótica e iônica, regulação do equilíbrio ácido-básico e excreção de nitrogênio em crustáceos aquáticos (BURGGREN & MCMAHON, 1988). A maioria dessas funções requer água e são interrompidas quando as brânquias perdem o contato com o meio-ambiente aquático. Geralmente essas funções não podem ser “tomadas” por órgãos acessórios para respiração aérea e, conseqüentemente devem ser assimiladas por outros sistemas corpóreos. Esta assimilação, para os caranguejos, pode ter envolvido alguns passos evolutivos relativamente complexos, como pôde ser demonstrado pelo estudo de uma grande variedade de espécies terrestres e semi-terrestres. Enquanto o tamanho e a área de superfície das brânquias foi reduzido devido ao aumento da habilidade de absorver o oxigênio do ar, as brânquias foram mantidas, mesmo nas formas mais terrestres (BURGGREN & MCMAHON, 1988). No entanto, mesmo as espécies mais terrestres são, em certo grau, dependentes das brânquias e necessitam, pelo menos, de um contato intermitente com a água.

As brânquias são constituídas por uma camada simples de células epiteliais, onde a superfície basal das células é banhada pela hemolinfa, que circula em uma lacuna e está

localizada sobre uma cutícula. Esta camada de células epiteliais pode ser fina (células com 1-2µm de espessura), ou espessa (células com 10-20 µm de espessura). O epitélio fino está relacionado à função respiratória e o epitélio espesso ao transporte de íons e água (MANTEL & FARMER, 1983). Outros tipos de células podem estar presentes, como células pilares, nefrócitos (células fagocíticas fixas) e axônios. A cutícula que reveste as lamelas branquiais possui de 2-4 µm de espessura, enquanto que a cutícula que reveste as estruturas de suporte são mais espessas (MANTEL & FARMER, 1983; PÉQUEUX, 1995).

A estrutura básica das brânquias inclui células que são separadas da hemolinfa por uma membrana no lado basal e coberta por uma cutícula do lado apical. A superfície basolateral possui invaginações associadas a numerosas mitocôndrias, enquanto a superfície apical é normalmente composta por canais e microvilos (MANTEL & FARMER, 1983). A superfície da região apical das células formam profundos canais (ou microvilos), os quais se organizam em projeções paralelas (horizontais), formando complexas interdigitações, ao invés de projeções individuais (COPELAND & FITZJARREL, 1968). Septos e outras junções geralmente se estendem de região apical até o citoplasma. Também são observados retículos endoplasmáticos lisos e rugosos, microfilamentos e corpos vesiculares.

Em crustáceos estuarinos (hiperreguladores) e dulcícolas, as brânquias são o primeiro sítio de absorção ativa e perda passiva de sais. Em *Astacus astacus* (BRYAN, 1960a, b) a perda de Na⁺ pela urina constitui somente 5,5% do total de efluxo de Na⁺, e em *Potamon niloticus* (SHAW, 1959b) a perda é de menos de 1% do total. Animais incapazes de efetuar reabsorção renal apresentam altas taxas também de perda urinária, como observado em *Carcinus maenas*, que apresenta uma perda de 21% de Na⁺, sendo que a principal via para a perda ainda é extra-renal. Apesar dos crustáceos hiperreguladores absorverem íons via ingestão (AHEARN *et al.*, 1977), as brânquias são o principal sítio de absorção.

KROGH em 1939, já havia proposto que o Na⁺ e o Cl⁻ são absorvidos do meio externo através da superfície apical das células epiteliais branquiais via mecanismos carreadores separados. Sistemas independentes de absorção de íons têm sido observados em todos os crustáceos hiperreguladores e SHAW, em 1960, demonstrou em *Eriocheir sinensis* a absorção de Na⁺ a partir de soluções de NaCl, Na₂SO₄ e NaHCO₃, e a absorção de Cl⁻ a partir de soluções de NaCl, KCl, NH₄Cl e CaCl₂. Em *Astacus*, o Km e o V_{max} desses dois sistemas de absorção são distintos (SHAW, 1959a, 1960).

Em caranguejos osmorreguladores e em caranguejos semi-terrestres, a atividade das ATPases é maior nas brânquias posteriores que o observado em brânquias anteriores e foi observado também um grande aumento na atividade das ATPases nas brânquias posteriores durante a aclimação do animal à água do mar diluída (PÉQUEUX & GILLES, 1978; SPENCER *et al.*, 1979; NEUFELD *et al.*, 1980). Estas diferenças se correlacionam com as diferenças observadas nas estruturas das brânquias anteriores e posteriores.

2.3.2 – Glândula antenal

Embora as brânquias sejam consideradas o principal órgão responsável pelo controle da osmolalidade da hemolinfa em crustáceos aquáticos, a glândula antenal, órgão renal dos crustáceos, também exerce importante papel na manutenção do volume e composição iônica nesses animais (WHEATLY *et al.*, 2004).

As glândulas antenais pareadas estão localizadas adjacentes às antenas, cada uma consistindo de um saco terminal, labirinto, canal nefridial e bexiga (BARNES, 1990). Os poros excretores abrem-se na superfície inferior das bases das segundas antenas. O filtrado inicial que entra na glândula antenal é isosmótico à hemolinfa e modificações por processos de reabsorção e secreção tubular ocorrem através da passagem deste filtrado pela glândula antenal (MANTEL & FARMER, 1983). A morfologia do órgão excretor pareado em crustáceos segue uma estrutura básica que compreende um sáculo envolto no remanescente do celoma; um canal excretor que pode se apresentar altamente subdividido em um labirinto; e um duto de saída que pode ser expandido em uma grande bexiga. Em alguns crustáceos os dutos de saída se abrem sobre o terceiro segmento antenal (decápodos, por exemplo). Nos decápodos mais antigos e em alguns malacostracas, estas aberturas ocorrem no sexto segmento maxilar (PARRY, 1960).

Nas glândulas antenais há um sáculo de fundo cego rodeado por três espirais do duto excretor, os quais terminam no duto terminal e também apresentam mitocôndrias, corpos densos, lisossomos e vacúolos. O sáculo recebe a hemolinfa através de uma rede de túbulos e ligações de tecido conjuntivo (artérias antenais) que se ligam ao sáculo (TYSON, 1968), onde uma delicada estrutura de filtração composta por duas membranas de filtração adjacentes à membrana basal (camada de podócitos dentro do lúmen do sáculo) forma a urina primária, onde proteínas maiores que a ferritina e ferrocianina (peso molecular de aproximadamente 450Kd) atravessam a membrana basal, mas não atravessam as

membranas de filtração. Esta situação contrasta com o observado em glomérulos de vertebrados, onde a barreira de filtração primária à filtração de proteínas é a membrana basal.

O fluído produzido na glândula antenal se move do sáculo através do labirinto e túbulo nefridial para a bexiga e é modificado pela reabsorção e secreção de íons, água e materiais orgânicos durante a sua passagem. As células do labirinto e canal nefridial são formadas por uma delicada estrutura de células epiteliais, apresentando junções aderentes e desmossomos na superfície apical das células, mas com variações regionais no tamanho e nas propriedades histoquímicas (PETERSON & LOIZZI, 1973). Na região proximal do labirinto, as células apresentam microvilosidades bem definidas e com grande quantidade de mitocôndrias. Na região basolateral das células, extensas interdigitações e longos e estreitos espaços intercelulares são comuns. A porção distal do labirinto apresenta células com vesículas endocitóticas (especialmente na região apical) e menor quantidade de interdigitações, sendo que estas células podem recolher proteínas (PETERSON & LOIZZI, 1974). No canal nefridial as células não apresentam microvilosidades na região apical, mas interdigitações associadas com mitocôndrias estão presentes.

A bexiga, que pode representar de 2 a 4% do peso corpóreo em caranguejos e lagostins aparenta ser o local de absorção e secreção de íons e água (GROSS & CAPEN, 1966; RIEGEL *et al.*, 1974; RIEGEL & COOK, 1975; HOLLIDAY & MILLER, 1980; RIEGEL, 1972; MANTEL & FARMER, 1983). As células da bexiga apresentam na região apical microvilosidades, glicocálice, interdigitações, e vacúolos que podem estar relacionados com a secreção de ácidos orgânicos (RIEGEL & COOK, 1975; HOLLIDAY, 1980). No entanto, a maioria dos crustáceos, inclusive as espécies dulcícolas e terrestres, produzem urina isosmótica à hemolinfa, embora a glândula antenal dos lagostins seja capaz de produzir urina hipoosmótica (LOCKWOOD, 1977; MANTEL & FARMER, 1983; SARVER *et al.*, 1994). Esta habilidade tem sido relacionada à presença de um alongado segmento tubular que pode ser diferenciado em regiões proximal, distal (MANTEL & FARMER, 1983) e bexiga (RIEGEL *et al.*, 1974)

2.3.3 – Hepatopâncreas

O hepatopâncreas é responsável por produzir praticamente todas as enzimas digestivas livres do intestino e é também responsável por 85% da absorção alimentar (MANTEL & FARMER, 1983). Aparentemente, o hepatopâncreas dos crustáceos alcançou

seu maior grau de elaboração nos decápodos, onde compreende de 2 a 6% da massa corporal (BROCKERHOFF & HOYLE, 1967; STEWART *et al.*, 1967). O órgão consiste em um grande agrupamento de túbulos compactos dispostos em cada lado do trato digestivo, onde preenche grande parte do cefalotórax. Nos caranguejos heremitas (pagurídeos), o hepatopâncreas está localizado no abdômen e está desenvolvido assimetricamente. Cada metade do hepatopâncreas é composta por 2 ou 3 lóbulos envolvidos por uma membrana de tecido concêntrico provida de uma delicada rede de células musculares circulares e longitudinais. Cada lado do hepatopâncreas se liga ao intestino por um ducto próximo à junção estômago pilórico- intestinal (GIBSON & BARKER, 1979). O ducto primário se ramifica em ductos secundários que “penetram” nos lóbulos, onde se subdividem extensivamente até formarem dúzias de túbulos de fundo-cego. Os túbulos possuem coloração variada, sendo geralmente amarelos, marrons ou esverdeados.

Células musculares envolvem cada túbulo do hepatopâncreas. Células musculares mononucleares, espessas e estriadas têm sido identificadas juntamente com células musculares longitudinais lisas que parecem se conectar com os músculos circulares adjacentes. Contrações dos músculos que envolvem os túbulos ejetam as enzimas digestivas no intestino e levam os nutrientes para dentro do hepatopâncreas (LOIZZI, 1971).

Os túbulos do hepatopâncreas apresentam uma camada única de células epiteliais, exceto na região distal ou de fundo cego onde várias camadas de células existem. Segundo GIBSON e BARKER (1979), quatro tipos de células epiteliais foram identificadas: células E (embrionárias ou indiferenciadas), F (fibrilares), R (absortivas) e B (secretoras). As células E são encontradas somente na região distal final dos túbulos, onde ficam sob divisão mitótica. Essas células parecem se especializar em células F ou R enquanto migram através do túbulo para a região proximal. As células F apresentam um extenso e desenvolvido retículo endoplasmático, numerosos complexos de Golgi, vacúolos e vesículas. Essas características sugerem que as células F sintetizem enzimas digestivas. No entanto GIBSON e BARKER (1979) comentam que as células F parecem se diferenciar em células B (secretoras), as maiores células hepatopancreáticas. Já as células B apresentam um único e grande vacúolo secretor, compreendendo aproximadamente 90% do volume total da célula (BARKER & GIBSON, 1977). Apresentam, também, em sua região apical microvilosidades que se projetam dentro do lúmen dos túbulos. As células B são secretoras de enzimas digestivas.

As células R são as células mais abundantes, ocorrendo através de toda a extensão dos túbulos do hepatopâncreas, exceto na região distal final, onde as células embrionárias

(E) ainda não se diferenciaram. As células R contêm um grande número de vacúolos e microvilosidades na região apical; as células R lembram as células de absorção do intestino dos vertebrados (MANTEL & FARMER, 1983). Grânulos de glicogênio e gotículas de lipídios são evidentes e essa evidência indica que as células R são as principais células de absorção e depósito do hepatopâncreas.

Artérias hepáticas passam através dos lóbulos do hepatopâncreas onde se subdividem em dutos e túbulos, formando capilares (GIBSON & BARKER, 1979). Presume-se que os nutrientes passem do hepatopâncreas para a hemolinfa.

2.4 – Regulação iônica em crustáceos em relação ao Ca^{2+}

Os crustáceos formam um grupo muito diverso de organismos que vivem em uma grande variedade de habitats, incluindo o dulcícola, marinho e terrestre. Uma grande parte dessas espécies encontradas nesses diferentes ambientes apresentam uma grande plasticidade fisiológica e desenvolveram mecanismos para manter as concentrações de seus fluídos no meio-ambiente em que vivem. Os desafios em termos de adaptações funcionais nos organismos que habitam esses diferentes ambientes, geralmente envolvem adaptações especializadas de camadas de células epiteliais encontradas nas brânquias, tegumento, intestino (hepatopâncreas) e glândula antenal, as quais permitem aos animais regular a passagem de moléculas como íons entre o ambiente externo e a hemolinfa. Estas adaptações podem se apresentar em nível molecular, celular ou tecidual, sendo que essas especializações são modificadas por processos de controle hormonal (AHEARN *et al.*, 1999).

A regulação iônica em crustáceos é extremamente variável e dependente do ambiente onde são encontrados, onde as concentrações nestes variam desde 0 -15 mOsm • $\text{Kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ (água doce) até >1,000 mOsm • $\text{Kg}^{-1} \text{H}_2\text{O}$ (meio hipersalino). Em caranguejos aquáticos, a regulação iônica é efetuada em grande parte pelas brânquias (MANTEL & FARMER, 1983), já caranguejos terrestres, semi-terrestres e dulcícolas, desenvolveram mecanismos fisiológicos para conservação de Ca^{2+} como o armazenamento em gastrólitos (UENO, 1980), hemolinfa e hepatopâncreas (revisado em GREENAWAY, 1985). Em caranguejos terrestres, o acesso limitado aos íons do ambiente aquático durante a ecdise, explica o porque da necessidade de acumularem íons durante a muda (revisado por ZANOTTO, 2003). Basicamente os caranguejos terrestres fazem a tomada de cálcio a partir da alimentação e ingestão de líquidos, mas em alguns casos, o conteúdo de Ca^{2+} urinário

pode ser modificado por meio da reabsorção de até 80% deste íon, após este ter sido reciclado no compartimento branquial (WOLCOTT & WOLCOTT, 1982, 1985, 1991; GRENAWAY & MORRIS, 1989; MORRIS *et al.*, 1991).

Quatro tecidos epiteliais de crustáceos são especializados para troca bi-direcional específica de Ca^{2+} . (i) As brânquias são os órgãos de difusão passiva e/ou transferência ativa de Ca^{2+} em espécies aquáticas e possuem também a função pós-renal de modificar o conteúdo iônico da urina em espécies terrestres. (ii) O epitélio do sistema digestório é também local de entrada de Ca^{2+} proveniente dos alimentos/líquido, como também responsável por sua estocagem, isso em todas as espécies, tanto aquáticas quanto terrestres. (iii) As glândulas antenais (análogas aos rins em vertebrados) podem também estar envolvidas na modificação urinária pós-filtracional (em lagostim de água doce, por exemplo), embora caranguejos produzam tipicamente urina iso-osmótica. (iv) A camada da hipoderme da cutícula também sofre desmineralização e re-mineralização em diferentes estágios do ciclo da muda (WHEATLY, 1999).

2.5 – Sistemas modelo celulares para o transporte de Ca^{2+} transepitelial

Em adição aos muitos processos celulares regulados pelo Ca^{2+} , os crustáceos apresentam uma particular necessidade deste íon devido ao fato de ser o principal constituinte do exoesqueleto desses animais e por sofrer grandes mudanças de concentração durante a ecdise. Grande parte do Ca^{2+} presente no exoesqueleto é perdido para o meio-ambiente ou armazenado em tecidos especializados para a muda em crustáceos (GLYNN, 1968; GREENAWAY, 1974a, 1985; JOHNSON, 1980; ROER, 1980).

Existem 4 órgãos providos de tecidos epiteliais que controlam a concentração do cálcio na hemolinfa de um crustáceo: o intestino (hepatopâncreas), os rins (glândulas antenais), as brânquias e o tegumento da epiderme. Em qualquer estágio da alimentação ou do ciclo de muda, estas 4 camadas celulares estão ligadas hormonalmente e transferem o cátion através das respectivas camadas celulares para todo o organismo segundo as características fisiológicas de cada um (AHEARN *et al.*, 1999).

As trocas de Ca^{2+} e outros íons de significância biológica em crustáceos ocorrem entre a hemolinfa e o meio-ambiente através destes tecidos especializados e durante a

maior parte do ciclo de vida, estas trocas são modestas e principalmente regulatórias, mas durante as mudas periódicas, um grande movimento de íons, especialmente Ca^{2+} , ocorre entre o organismo e seu meio-ambiente. Estes movimentos de íons devem ser regulados de modo que o animal cresça e reforce o novo exoesqueleto, pois após a muda, os animais devem rapidamente calcificar o novo exoesqueleto pela absorção do Ca^{2+} presente no meio ou pela liberação do Ca^{2+} armazenado, o qual passa para a hemolinfa e retorna para o tegumento para a ligação química com o ânion carbonato e outros componentes do exoesqueleto (GREENAWAY, 1974b, 1985; CAMERON, 1989).

Atualmente, modelos de sistemas de transporte celular de Ca^{2+} , são baseados principalmente em estudos com vesículas de crustáceos marinhos em fase de intermuda (FLIK *et al.*, 1994, vesículas de membrana basolateral “inside-out” (IOVs) de brânquias de *Carcinus*; AHEARN & FRANCO, 1993, AHEARN & ZHUANG, 1996, ZHUANG & AHEARN, 1996, vesículas apicais e basolaterais de glândulas antenais e hepatopâncreas de lagostas), onde o Ca^{2+} entra passivamente para o citosol (do meio aquático externo/fluido luminal) através de canais de Ca^{2+} apicais que são usualmente inibidos por verapamil. A entrada de Ca^{2+} apical envolve também o trocador de $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$ ($n\text{H}^+$) que pode ser eletrogênico ou eletroneuro. Trocadores basolaterais, por outro lado, envolvem (i) o trocador de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ que apresenta baixa afinidade e alta capacidade, responsável pelo efluxo de Ca^{2+} ($K_m = 1.78 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 1.73 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg pr}^{-1}$, em brânquias, FLIK *et al.*, 1994; $K_m = 0.31 \text{ mM}$, $V_{\text{max}} = 9.9 \text{ pmol} \cdot \text{mg pr}^{-1} \cdot 8\text{s}^{-1}$, em hepatopâncreas, AHEARN & ZHUANG 1996) (ii) uma bomba de Ca^{2+} -ATPase, calmodulina-dependente, que apresenta alta afinidade e baixa capacidade, que regulam os níveis de Ca^{2+} intracelular ($K_m = 149 \text{ nM}$, $V_{\text{max}} = 1.73 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg pr}^{-1}$, Flik *et al.*, 1994) e (iii) um canal de cálcio inibido por verapamil que se abre em células do hepatopâncreas em fase de pré-muda, admitindo Ca^{2+} para armazenamento intracelular.

Segundo ZHUANG e AHEARN (1998) e WHEATLY e colaboradores (2001), o trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ é um importante mecanismo na tomada de Ca^{2+} principalmente durante a fase de muda, pois como já citado, apresenta alta capacidade e baixa afinidade, condizente com altas quantidades de fluxo de Ca^{2+} que ocorrem na pós-muda em lagostas e lagostins. Geralmente a Ca^{2+} -ATPase presente na membrana plasmática apresenta maior afinidade que o trocador. Em lagostins, a capacidade de entrada de cálcio pelo trocador é maior que pela Ca^{2+} -ATPase, sendo que o trocador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ é responsável por 97% do efluxo de cálcio em toda a atividade deste íon no meio intracelular (revisado por ZANOTTO, 2003). Essa tendência é oposta em lagostas, onde a Ca^{2+} -ATPase apresenta o dobro da capacidade do trocador, sendo que 90% do efluxo de cálcio ocorre por essa via (revisado

por ZANOTTO, 2003).

Experimentos realizados com o isópodo *Porcellio scaber*, também um crustáceo, constataram um aumento na expressão do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que ocorria entre o começo e o final da pré-muda (ZIEGLER *et al*, 2002). O aumento da expressão do trocador nesse período sugere também um papel desse transportador nos processos relacionados com a muda, como em lagostins. Esses processos incluem a desmineralização e reabsorção da velha cutícula e a secreção e mineralização de uma nova matriz cuticular (ZIEGLER *et al*, 2002).

Os mecanismos de transporte de cálcio em hepatopâncreas e glândula antenal de lagosta foram caracterizados e foram observadas semelhanças nos processos de transporte (AHEARN & FRANCO, 1990, 1993; AHEARN & ZHUANG, 1996; ZHUANG & AHEARN, 1996). Em geral, os dados obtidos em células epiteliais de hepatopâncreas e brânquias em lagostas, lagostins e caranguejos nos últimos anos sugerem um ponto comum entre as espécies de crustáceos que aparentam ser relativamente independentes da composição iônica da hemolinfa ou ambiental, e é baseada, também, em evidências de células de vertebrados. As proteínas transportadoras basolaterais de transporte de Ca^{2+} aparentam ter se desenvolvido através dos tecidos e dos Filos de modo a regular o Ca^{2+} intracelular dentro de uma pequena faixa de variação desconsiderando as outras funções biológicas que ocorrem no animal, como o ciclo de muda, alimentação ou osmorregulação.

A combinação de transportadores que apresentam alta e baixas afinidades na mesma membrana garante que as atividades intracelulares do cálcio serão suficientemente controladas/reguladas a valores tecido-específicos, não importando se pequenas ou grandes variações nas atividades do cálcio ocorrem no ambiente ou na hemolinfa.

2.6 – Influência da Na^+/K^+ ATPase no transporte de Ca^{2+} transepitelial

Os epitélios osmorregulatórios dos crustáceos são caracterizados por uma alta atividade da Na^+/K^+ ATPase (MANTEL & FARMER, 1983; LUCU, 1990; PEQUEUX, 1995). Segundo FLIK e colaboradores (1994), TOWLE e KAYS (1986) e TOWLE e MANGUM

(1985), a atividade da Na^+/K^+ ATPase é crucial na pré-muda (e início da pós-muda), por prover um gradiente de Na^+ para um transporte secundário de Ca^{2+} através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, necessário para a calcificação do exoesqueleto. O epitélio branquial dos crustáceos é particularmente rico em Na^+/K^+ ATPases sensíveis à ouabaína (FLIK *et al.*, 1994; TOWLE, 1990). A Na^+/K^+ ATPase é também chave para uma variedade de processos de transporte que demandam energia (LUCU, 1990; LUCU & SIEBERS, 1986). A atividade desta enzima governa diretamente as trocas Na^+/H^+ (LUCU & SIEBERS, 1986; SHETLAR & TOWLE, 1989; TOWLE *et al.*, 1997), bem como o co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ na membrana apical (RIESTENPATT *et al.*, 1996) e regula secundariamente a troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ na membrana basolateral.

Foi observado por LUCU e SIEBERS (1987) uma inibição do influxo de Na^+ pela ouabaína serosal em brânquias isoladas e perfundidas de *Calinectes* e também dependente da atividade da Na^+/K^+ ATPase. ONKEN e SIEBERS (1992) observaram que a atividade da Na^+/K^+ ATPase (em corrente de curto-circuito – I_{SC}) foi inibida em 85% pela ouabaína em uma preparação hemilamelar de *Carcinus*.

3 – Justificativa

A partir da revisão da literatura acima, foi desenvolvida a hipótese de que a absorção de Ca^{2+} pelas brânquias, hepatopâncreas e glândulas antenais depende de certo modo do gradiente gerado pela Na^+/K^+ ATPase e, conseqüentemente, poderia afetar a mineralização/desmineralização do exoesqueleto em um contínuo de caranguejos terrestres, que apresentam diferentes níveis de terrestrialidade.

Os trabalhos feitos até o momento com transporte de Ca^{2+} em crustáceos focalizaram no transporte desse íon através do uso de vesículas de membrana plasmática, e, principalmente, utilizando crustáceos marinhos ou de água doce. O presente plano de trabalho apresenta um enfoque original, por motivos enumerados a seguir:

1. Os crustáceos utilizados no presente estudo apresentam diferentes níveis de terrestrialidade e, portanto, o modelo a ser utilizado serão crustáceos não-aquáticos;
2. O transporte de Ca^{2+} foi medido a partir de marcadores fluorescentes de Ca^{2+} , utilizando-se como ponto de partida células inteiras, obtendo-se, portanto, uma visão mais holística da célula e seus transportadores;
3. Os trabalhos com transporte de Ca^{2+} até o momento foram feitos com animais em inter-muda e animais em pós-muda também foram utilizados no presente projeto, pois é nesse período que os crustáceos apresentam altas demandas de Ca^{2+} para calcificação do novo exoesqueleto.

4 – Objetivos

Objetivo 1: Comprovar a ação conjugada de inibidores sobre a tomada de Ca^{2+} em brânquias, glândulas antenais e hepatopâncreas, a partir de animais em fase de intermuda e pós-muda. Os inibidores a serem utilizados serão o verapamil (inibidor dos canais de Ca^{2+}) e o amiloride (inibidor do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$).

Objetivo 2: Comprovar a ação indireta da ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ ATPase) sobre a tomada de Ca^{2+} através de trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, comprovando a necessidade de um gradiente de Na^+ para o transporte secundário de Ca^{2+} , com a utilização de células isoladas preparadas a partir de animais em fase de intermuda e pós-muda.

5 – Material e métodos

5.1 – Animais utilizados no estudo

As espécies utilizadas nesse estudo encontram-se disponíveis nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro e são filogeneticamente relacionadas, para atender aos objetivos de estudos comparativos de acordo com HARVEY e PAGEL (1991). Os caranguejos utilizados são todos da Superfamília Grapsoidea, habitam ambientes com salinidade variável e mostram diferentes níveis de terrestrialidade (ver MELO, 1996 e SCHUBART *et al.*, 2000): *S. rectum* e *G. cruentata* apresentam nível T_3 de terrestrialidade, enquanto que *C. granulatus* apresenta nível T_2 .



Sesarma rectum, espécie herbívora, reside normalmente em manguezais. Sua distribuição se estende do Amapá até Santa Catarina (MELO, 1996). Geralmente entram em fase de muda o ano todo, apresentando o comprimento médio de carapaça de 21 mm. Nível de terrestrialidade T_3 .

Figura 1: O caranguejo *Sesarma rectum* (Crustacea-Decapoda-Grapsidae).



O caranguejo *Chasmagnathus granulatus*, Dana 1851 que habita o meso-litoral em substratos areno-lodosos e lodosos (CAPITOLI *et al.*, 1978), forma extensas comunidades às margens das marismas da costa sul brasileira, sendo que sua distribuição geográfica limita-se entre o litoral do Rio de Janeiro e o litoral patagônico (BOSCHI, 1964). No estuário da Lagoa dos Patos e na Praia do Jabaquara, em Paratí, este caranguejo apresenta hábito alimentar omnívoro-detrítivo, desempenhando um importante papel na cadeia trófica estuarina, por ocasionar aceleração de processos de transferência de energia entre os níveis tróficos (D'INCAO *et al.*, 1990). Nível de terrestrialidade T_2 .

Figura 2: O caranguejo *Chasmagnathus granulatus* (Crustacea-Decapoda-Grapsidae).



Figura 3: O caranguejo *Goniopsis cruentata* (Crustacea-Decapoda-Grapsidae).

O caranguejo *Goniopsis cruentata* reside em manguezais, sobre raízes ou troncos de árvores. Em praias lodosas, em braços de mar ou estuários. Do supra-litoral até o entre-marés. Sua distribuição geográfica vai desde o Atlântico Ocidental – Bermuda, Flórida, Golfo do México, Antilhas Guianas e Brasil (Fernando de Noronha e do Pará até Santa Catarina). Atlântico Oriental – do Senegal até Angola. Nível de terrestrialidade T₃.

5.2 – Manutenção dos animais em laboratório

Caranguejos adultos, machos e fêmeas, no estágio de intermuda foram coletados manualmente, transportados e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IB-USP. As coletas foram realizadas no período de Fevereiro de 2003 a Novembro de 2005.

Os caranguejos da espécie *Sesarma rectum* foram coletados no mangue localizado às margens do Rio Itaguapé em Bertioga – SP, levados para o biotério, e mantidos em um tanque grande (350 litros), com água do mar a 16‰ em uma bandeja (para que os animais pudessem se movimentar tanto pela parte seca como pela parte úmida do tanque), e tijolos baianos (com oito furos) para simular tocas. A troca de água e alimentação foi feita três vezes por semana e a alimentação composta por folhas de mangue e ração de peixe peletizada.

Os caranguejos da espécie *Chasmagnathus granulatus* foram coletados na Lagoa dos Patos – RS e no mangue localizado na Praia do Jabaquara em Parati – RJ e mantidos submersos em um tanque (130 litros) com filtro biológico e água do mar a 16‰, sistema de aeração e tijolos baianos expostos ao ar, para que os animais pudessem escolher por submergir ou emergir. Estes animais foram alimentados três vezes por semana com carne moída e ração de peixe peletizada.

Os caranguejos da espécie *Goniopsis cruentata* foram coletados no mangue localizado às margens do Rio Itaguapé em Bertioga – SP e no mangue localizado na Praia Vermelha em Ubatuba – SP e mantidos, da mesma maneira que *S. rectum*, em um tanque (350 litros), com

água do mar a 16‰ e uma bandeja e tijolos baianos. A troca de água e alimentação foi feita três vezes por semana, sendo alimentados com folhas de mangue, carne moída e ração de peixe peletizada.

Para a obtenção de animais em fase de pós-muda, foram montadas duas estantes, cada uma contendo 38 caixas de plástico (4 litros), com torneiras para troca de água e sistema de aeração. Em cada uma das caixas foi colocado 01 animal (de qualquer uma das três espécies), contendo aproximadamente 500ml de água do mar a 16‰, a qual foi trocada três vezes por semana, assim como a alimentação. Estes animais foram selecionados dos tanques de manutenção e colocados nas caixas individuais por um período de aproximadamente 15 dias, pois foi observado que este processo facilita a muda dos animais e evita canibalismo. Não havendo muda após este período, os animais foram retornados aos tanques e substituídos por outros exemplares.

O biotério foi mantido à temperatura constante de 25°C e fotoperíodo de 11/13 horas (claro/ escuro).

A água do mar utilizada na manutenção dos animais teve procedência do Instituto Oceanográfico – IO-USP, situado em Ubatuba - SP, e a salinidade 16‰ foi obtida por diluição com água destilada e aferida com um refratômetro.

5.3 – Análise da hemolinfa dos animais

Para a determinação de um tampão equivalente à hemolinfa dos animais, amostras foram retiradas e imediatamente congeladas para posterior análise. Para a análise, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e vigorosamente agitadas até que o coágulo pudesse ser desfeito. Alíquotas foram obtidas para as diferentes análises em osmômetro de pressão de vapor, espectrofotômetro de absorção atômica e por meio de titulação. Utilizou-se então esses dados para a preparação dos seguintes tampões ($\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$):

- *Sesarma rectum* – 250 NaCl₂, 22 cloreto de colina ($\text{C}_5\text{H}_{14}\text{NO} \cdot \text{Cl}$), 10 KCl₂, 2 NaHCO₃, 1 KH₂PO₄, 5 glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 5 HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 150 sacarose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) a pH 7,4 alterado com Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), osmolalidade 680 mosmol $\cdot \text{kg}^{-1}$;

- *Chasmagnathus granulatus* – 373,5 NaCl₂, 109 gliconato de Na⁺ (C₆H₁₁NaO₇), 2 NaHCO₃, 9,05 gliconato de K⁺ (C₆H₁₁O₇K), 2 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 5 glicose (C₆H₁₂O₆), 14 sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁), 5 HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S) a pH 7,6 alterado com Tris (C₄H₁₁NO₃), osmolaridade 887 mosmol • kg⁻¹;
- *Goniopsis cruentata* – 274.83 NaCl₂, 69,66 gliconato de Na⁺ (C₆H₁₁NaO₇), 5,17 KCl, 2 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 5 glicose (C₆H₁₂O₆), 127,34 sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁), 5 HEPES (C₈H₁₈N₂O₄S), pH 7,3 alterado com Tris (C₄H₁₁NO₃), osmolaridade 800 mosmol • kg⁻¹;

5.4 – Dispersão da células

Os animais foram anestesiados por resfriamento em congelador por aproximadamente 10 minutos, e então sacrificados para subsequente retirada dos tecidos.

O hepatopancreas e as brânquias foram retirados, cortados com auxílio de uma lâmina gillette e colocados em 15 ml de tampão equivalente à hemolinfa do animal em estudo + 45µl de PMSF, um inibidor de proteases (estoque 10 mM). Já para o tecido da glândula antenal utilizou-se 5 ml de tampão equivalente à hemolinfa do animal em estudo + 15 µl de PMSF (estoque 10 mM).

A mistura foi agitada a 110 rpm em gelo por 20 minutos para facilitar a dissociação das células epiteliais dos tecidos ao redor. A suspensão celular resultante foi então filtrada com o auxílio de uma gaze e centrifugada a 100g por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C. O “pellet” resultante foi re-suspensão em 1 ml do mesmo tampão.

As células foram, então, equilibradas em temperatura ambiente com 1 µl do marcador fluorescente para Ca²⁺ Fluo-3 (concentração final de 4 a 4,5 µM), dissolvido em DMSO e também foi adicionado 28 µl de probenescid (inibidor do transporte do ácido úrico, que também impede a saída do marcador do interior das células) em concentração final de 0,1 M dissolvido em DMSO, por 1 hora em agitação a 110 rpm .

Após este procedimento, a preparação foi centrifugada por duas vezes a 100g por 10 minutos, para lavagem do marcador que não penetrou nas células. O “pellet” resultante foi re-suspenso em tampão, sendo os volumes utilizados de 1 ml para hepatopâncreas, 0.8 ml para brânquias e 0.5 ml para glândula antenal. Após a última lavagem foi adicionado 10 μl de probenescid e mantidos em gelo.

5.5 – Transporte de Ca^{2+} no fluorímetro:

As medidas foram feitas em um fluorímetro (Hitachi) utilizando o software F4IC, e a mudança na fluorescência (excitação a 510 nm e emissão a 530 nm) foi medida em relação à adição de concentrações crescentes de Ca^{2+} no tampão, contendo as células dentro de uma cubeta de acrílico com volume de 2 ml e temperatura controlada a 25 °C.

Os inibidores ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ -ATPase, em concentração final 17,1 mM), verapamil (inibidor dos canais de Ca^{2+} , concentração final 40 mM) e amiloride (trocaador de Ca^{2+} ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, concentração final 12,7 mM) foram utilizados para quantificação do transporte de Ca^{2+} nas diferentes células e comparados ao controle (sem a adição de inibidores), de acordo com os seguintes volumes:

- 1,9 ml de tampão + 100 μl de células (controle);
- 1,85 ml de tampão + 100 μl de células + 50 μl de verapamil (solução estoque)
- 1,58 ml de tampão + 100 μl de células + 320 μl de amiloride (solução estoque)
- 1,89 ml de tampão + 100 μl de células + 10 μl de ouabaína (solução estoque)
- 1,53 ml de tampão + 100 μl de células + 50 μl de verapamil + 320 μl de amiloride.

As concentrações dos inibidores utilizadas foram baseadas em dados observados na literatura referente a experimentos de transporte em crustáceos e em testes “dose-resposta”. Em seguida, já no fluorímetro, crescentes concentrações de Ca^{2+} foram adicionadas à cubeta, sendo o intervalo entre as adições de 3 minutos para que se alcançasse o equilíbrio no transporte transcelular (testado anteriormente):

- Para hepatopâncreas e brânquias em *Sesarma rectum*, e hepatopâncreas em

Chasmagnathus granulatus, foram adicionados os seguintes volumes de CaCl_2 (1 M):

- 1 μl , 2 μl , 5 μl , 10 μl , 20 μl , 30 μl e 40 μl ;
- Para hepatopâncreas em *Goniopsis cruentata* foram adicionados os seguintes volumes de CaCl_2 (1 M):
 - 30 μl , 40 μl , 50 μl , 60 μl , 70 μl e 80 μl ;
- Para brânquias em *C. granulatus* e em *G. cruentata*, foram adicionados os seguintes volumes de CaCl_2 (1 M):
 - 20 μl , 30 μl , 40 μl , 50 μl , 60 μl e 70 μl ;
- Para glândula antenal em *S. rectum*, *C. granulatus* e em *G. cruentata*, foram adicionados os seguintes volumes de CaCl_2 (0.1 M):
 - 5 μl , 10 μl , 20 μl , 30 μl , 40 μl e 50 μl .

5.6 – Dosagem de proteínas totais

A concentração de proteína das amostras foi medida baseada no método de BRADFORD (1976). O método se baseia na ligação do Coomassie blue G250 à proteína. Sua forma catiônica predomina em soluções ácidas e tem uma absorvância máxima de 470 nm. Em contraste, sua forma aniônica, a qual se liga a proteínas, apresenta uma absorvância máxima a 595 nm. A ligação aparentemente ocorre nos resíduos arginil das proteínas (mas não se liga a aminoácidos), formando um complexo corado de cor violeta que é proporcional à concentração proteica da amostra.

A determinação das proteínas totais foi efetuada em espectrofotômetro em comprimento de onda a 595nm, sendo os volumes utilizados para a dosagem em glândula antenal: 70 μl de amostra de células de glândula antenal, 30 μl tampão, 1 ml de reagente de Bradford; e para a dosagem em brânquias e hepatopâncreas: 10 μl de amostra de células, 90 μl tampão, 1 ml de reagente de Bradford.

5.7 – Tratamento estatístico dos dados/ análise dos resultados

Os dados da cinética de tomada de Ca^{2+} , os quais seguem os padrões de cinética enzimática de Michaelis-Menten (parâmetros V_{Max} e KM) e de Hill (Coeficiente de Hill), foram ajustados para cada animal com a utilização do programa Sigma Plot (v7.101, 2001 SPSS Inc., Chicago, IL.) para os valores mais próximos de 1 e foram testados para normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homogeneidade de variância, através do teste de Levene.

Para avaliar o efeito dos diferentes tratamentos com inibidores em relação ao controle, foi utilizada análise de variância (ANOVA) de 2 fatores (tratamento e espécie), seguido pelo teste de médias múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) para localizar as médias estatisticamente diferentes para cada fator ($P < 0,05$), utilizando-se o pacote estatístico SPSS v10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). O teste foi feito individualmente para cada tecido, comparando-se as variáveis cinéticas de cada um. O mesmo teste foi feito para comparação dos animais em fase de intermuda e em fase de pós-muda.

6 – Resultados

Os resultados foram analisados visando fazer comparações entre os três caranguejos em fase de intermuda e pós-muda para verificar se a cinética de transporte de cada um dos epitélios (hepatopâncreas, brânquias e glândula antenal) é regulada de maneira diferente entre os diferentes caranguejos e se existe diferença na regulação entre os diferentes estágios de muda.

6.1 – Experimentos de transporte utilizando brânquias

A partir dos dados obtidos (Figura 4 e Tabelas 1 e 2), pôde-se observar que a cinética do transporte de Ca^{2+} em fase de intermuda e pós-muda utilizando os diferentes inibidores em brânquias de *Sesarma rectum* (concentração de Ca^{2+} 0 – 20 mM), *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* (concentrações de Ca^{2+} 0 – 35 mM), não seguem uma cinética típica de Michaelis-Menten. A curva de cinética observada foi uma curva sigmoidal de Hill com 4 parâmetros:

- Curva de cinética sigmoidal de Hill com 4 parâmetros:

$$V = V_0 + \frac{V_{\max} \cdot S^h}{K^h + S^h}$$

onde V_0 corresponde a velocidade inicial da reação, V_{\max} a velocidade máxima na qual ocorre a reação, S corresponde à concentração do substrato, K corresponde às constantes de afinidade do sítio ativo pelo substrato e h corresponde ao coeficiente de Hill.

O coeficiente de Hill pode ser definido como a medida de cooperatividade entre os sítios ativos de uma enzima. Os resultados sugerem que os transportadores de Ca^{2+} nas células de brânquias obedecem a uma cinética cooperativa (TIPTON, 1992; EISENTHAL e DANSON, 1992), onde a ligação do substrato (no caso o Ca^{2+}) aos transportadores facilita a ligação de mais íons Ca^{2+} a esses transportadores.

6.1.1 – Experimentos de transporte utilizando brânquias em fase de intermuda

Os resultados obtidos em experimentos de transporte de cálcio em brânquias de *Sesarma rectum*, *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* em fase de intermuda se encontram na Figura 4:

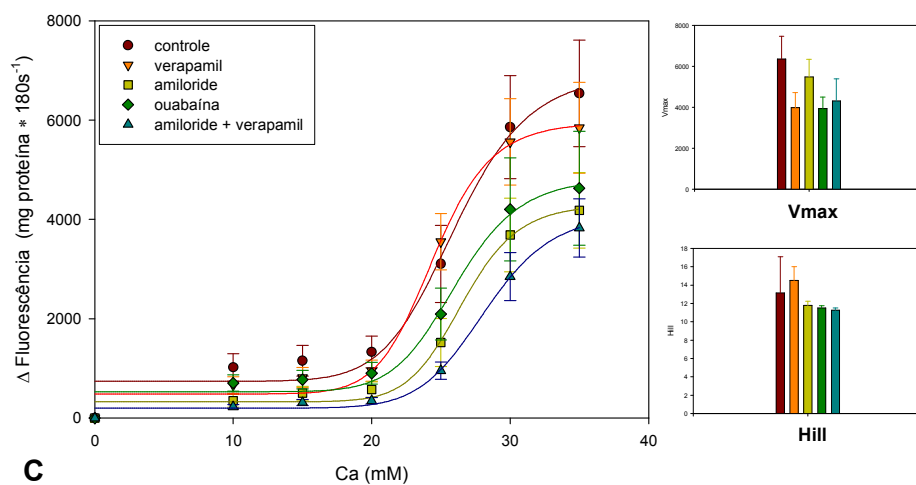
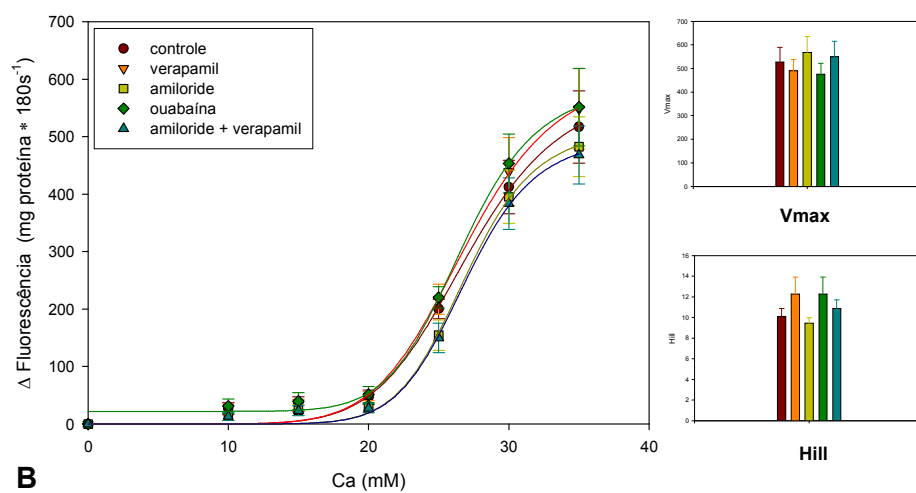
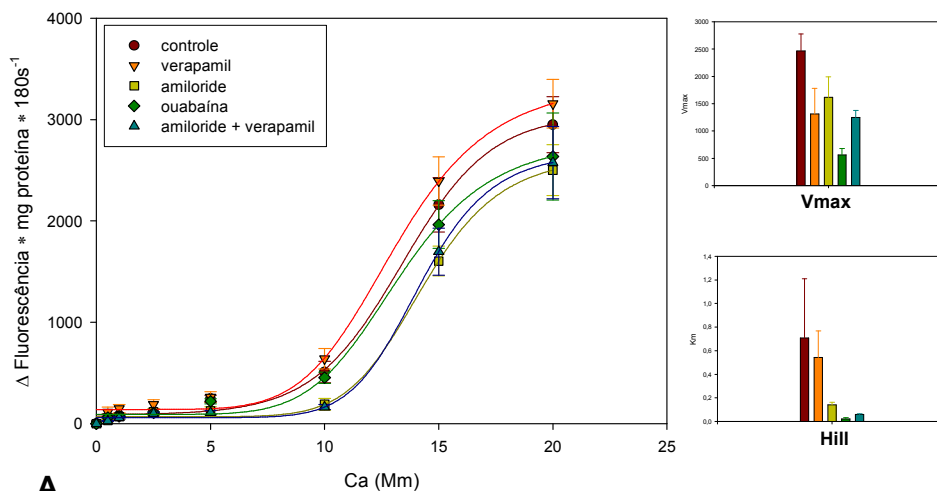


Figura 4: Mudança de fluorescência, V_{max} e coeficiente de Hill em células de brânquias em intermuda, após a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} e a adição dos inibidores verapamil, amiloride, ouabaina e amiloride junto com verapamil em (A) *S. rectum*, (B) *C. granulata* e em (C) *G. cruentata* (média \pm erro padrão, N = 4).

A adição de Ca^{2+} (concentrações de 0-35 mM) em brânquias em relação ao parâmetro V_{max} , mostrou que os tratamentos utilizados com inibidores não promoveram alterações estatisticamente significativas para nenhum dos caranguejos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 4; Tabela 1), apesar de ter sido observada uma tendência na redução de seus valores com os inibidores amiloride, verapamil e amiloride + verapamil conjugados. Porém, quando as espécies são comparadas entre si, observaram-se diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, $P < 0,001$), mostrando que *G. cruentata* apresentou valores aproximadamente 1,6 vezes maiores que os observados em *S. rectum* e 9 vezes maiores do que observados em *C. granulatus* (Figura 4 e Tabela 1).

Em brânquias, foi observado que o uso dos inibidores amiloride + verapamil conjugados promoveram uma redução em V_0 de aproximadamente 2,1 vezes em *S. rectum* e 2,9 vezes em *G. Cruentata* (ANOVA, $P < 0,05$). Já em *C. granulatus* houve apenas uma tendência à redução dos valores obtidos, no entanto esta não foi estatisticamente significativa (ANOVA, $P > 0,05$). A utilização do inibidor ouabaína promoveu um aumento significativo (ANOVA, $P < 0,05$) no parâmetro V_0 em *G. Cruentata* de 1,3 vezes, enquanto que em *C. granulatus* e em *S. rectum* este inibidor somente promoveu uma tendência não significativa a alterações nos valores obtidos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 4; Tabela 1). Já os inibidores amiloride e verapamil não promoveram alterações significativas (ANOVA, $P > 0,05$) em V_0 , no entanto apresentaram uma tendência a redução nos valores deste parâmetro. Quando as espécies são comparadas em fase de intermuda, *G. cruentata* apresentou valores significativamente maiores (4 vezes) em relação a *C. granulatus* e *S. rectum* (ANOVA, $P < 0,05$; Tabela1)

Com relação ao coeficiente de Hill, em relação aos tratamentos utilizados, não houveram alterações estatisticamente significativas em relação ao controle (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 4; Tabela 1). Quando as espécies são comparadas, *S. rectum* apresentou valores aproximadamente 1,5 vezes menores em relação a *G. cruentata* e *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,001$).

Tabela 1: Parâmetros de cinética tipo sigmoidal em células de brânquias em fase de intermuda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-35mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão).

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>S. rectum</i>	V_0	125,32 \pm 47,10	84,25 \pm 59,21	86,33 \pm 99,59	58,02 \pm 18,32*	89.34 \pm 21.79
	V_{\max}	2994.58 \pm 165.44	2583.80 \pm 78.59	2603.53 \pm 155.97	2719.79 \pm 82.73	2853.91 \pm 145.97
	Coeficiente de Hill	6.52 \pm 0.88	9.29 \pm 1.33	7.73 \pm 1.49	9.28 \pm 1.30	7.72 \pm 1.12
	K	13.17 ^{6.52}	14.05 ^{9.29}	14.39 ^{7.73}	14.07 ^{9.28}	12.42 ^{7.72}
	r^2	0.996	0.998	0.996	0.998	0.995
<i>C. granulatus</i>	V_0	21,17 \pm 8,97	12,95 \pm 5,14	19,16 \pm 8,17	12,56 \pm 4,94	22,95 \pm 8,52
	V_{\max}	527,12 \pm 40,26	490,19 \pm 23,77	568,10 \pm 39,99	475,48 \pm 23,05	550,86 \pm 38,69
	Coeficiente de Hill	10,08 \pm 1,94	12,27 \pm 1,55	9,45 \pm 1,51	12,27 \pm 1,55	10,88 \pm 2,08
	K	26,57 ^{10,08}	26,89 ^{12,27}	26,74 ^{9,45}	26,89 ^{12,27}	26,26 ^{10,88}
	r^2	0,995	0,997	0,996	0,997	0,995
<i>G. cruentata</i>	V_0	596,01 \pm 213,15	322,97 \pm 190,10	484,01 \pm 243,68	199,42 \pm 74,84*	746,34 \pm 341,54*
	V_{\max}	6353,41 \pm 1303,16	3978,33 \pm 365,44	5487,61 \pm 471,29	3942,47 \pm 308,63	4313,27 \pm 657,48
	Coeficiente de Hill	13,15 \pm 6,67	14,51 \pm 4,64	11,80 \pm 3,83	11,49 \pm 2,002	11,27 \pm 5,20
	K	26,32 ^{13,15}	26,66 ^{14,51}	24,44 ^{11,80}	28,31 ^{11,49}	26,08 ^{11,27}
	r^2	0,977	0,988	0,988	0,995	0,978

* P < 0,05

6.1.2 – Experimentos de transporte utilizando brânquias em fase de pós-muda

Os resultados obtidos em experimentos de transporte de cálcio em brânquias de *Sesarma rectum*, *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* em fase de pós-muda podem ser observados na Figura 5:

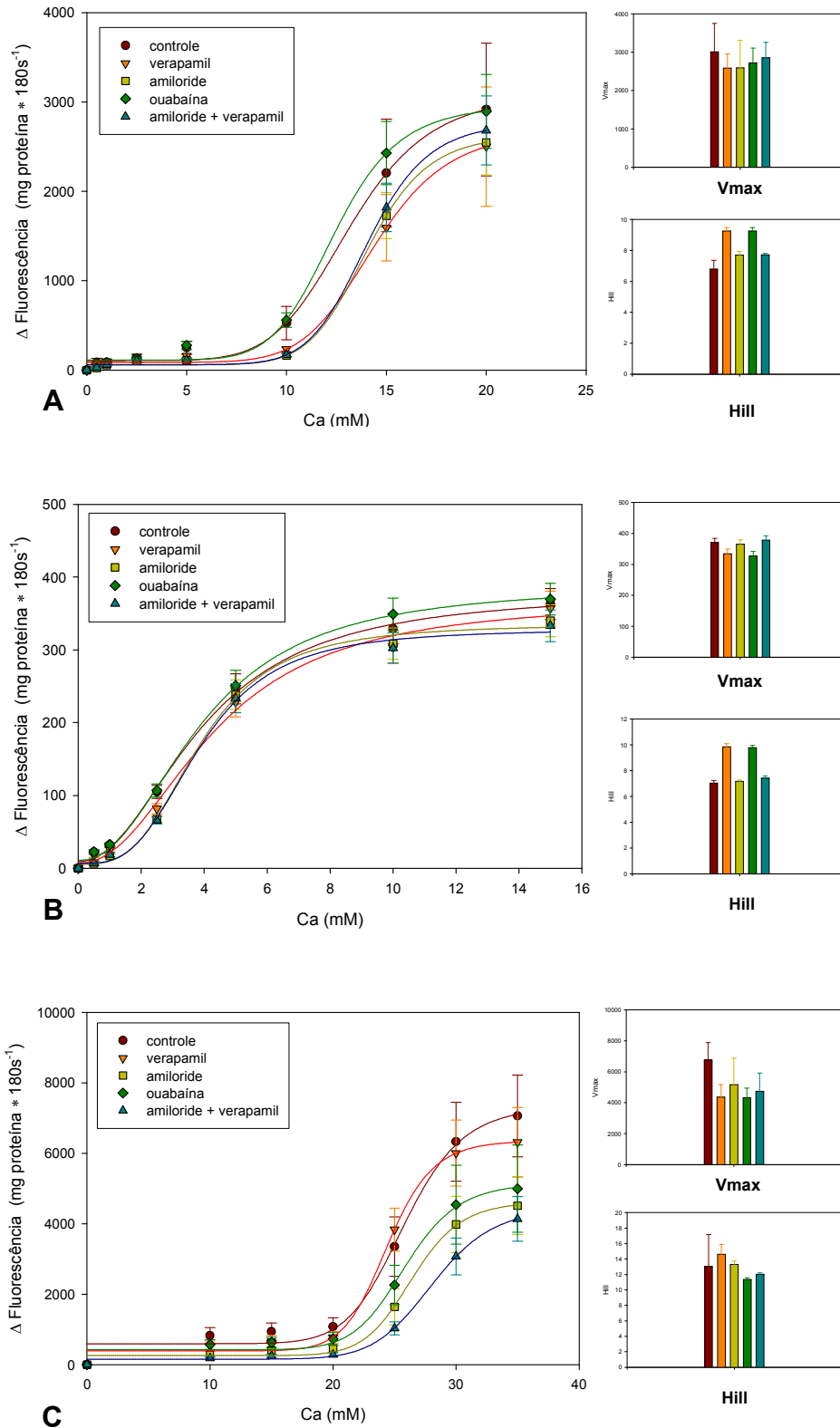


Figura 5: Mudança de fluorescência em células de brânquias, Vmax e coeficiente de Hill em pós-muda, após a adição de diferentes concentrações de Ca²⁺ e a adição dos inibidores verapamil, amiloride, ouabaina e amiloride junto com verapamil em (A) *S. rectum*, (B) *C. granulata* e em (C) *G. cruentata* (média \pm erro padrão, N = 4).

Para V_{max} , a adição de Ca^{2+} (concentrações de 0-35 mM) em brânquias promoveu uma redução nos valores obtidos nas 3 espécies utilizadas com relação ao inibidor amiloride (ANOVA, $P < 0,01$; Figura 5; Tabela 2). O uso dos inibidores amiloride e verapamil conjugados promoveram também uma redução nos valores obtidos nas 3 espécies utilizadas (ANOVA, $P < 0,01$; Figura 5; Tabela 2). A utilização do inibidor verapamil e ouabaina não causaram alterações significativas em V_{max} (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 5; Tabela 2). Quando as espécies são comparadas, foram observadas diferenças significantivas (ANOVA, $P < 0,001$) em relação aos valores obtidos de V_{max} , onde *G. cruentata* apresentou valores 1,6 maiores que os observados em *S. rectum* e 40 vezes maiores que em *C. granulatus* (Figura 5). Porém, em relação a *C. granulatus*, o padrão observado entre os tratamentos não foi semelhante aos outros caranguejos (interação espécie x tratamento; ANOVA, $P < 0,05$).

O parâmetro de cinética V_0 e os diferentes tratamentos utilizados não promoveram alterações significativas para nenhuma das espécies (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 2; Tabela 2). Quando comparadas, as 3 espécies utilizadas neste estudo apresentaram diferenças significativas (ANOVA, $P < 0,001$) onde *G. cruentata* apresentou valores aproximadamente 1,8 vezes maiores que os observados em *S. rectum* e 15 vezes maiores que em *C. granulatus* (Figura 2).

Para o coeficiente de Hill em fase de pós-muda, não houve alterações estatisticamente significativas com a utilização dos diferentes inibidores em relação ao controle (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 5; Tabela 2). Quando as espécies são comparadas, *G. cruentata* apresentou valores 1,5 vezes maiores em relação à *C. granulatus* e *S. rectum* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 5).

Tabela 2: Parâmetros de cinética tipo sigmoidal em células de brânquias em fase de pós-muda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-35mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão).

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>S. rectum</i>	V_0	107,24 \pm 41,89	58,21 \pm 21,58	86,57 \pm 31,70	61,27 \pm 22,76	112,53 \pm 45,78
	V_{\max}	3071,88 \pm 335,50	2584,92 \pm 80,32**	2595,39 \pm 159,37	2720,97 \pm 84,55**	2854,27 \pm 146,45
	Coeficiente de Hill	6,80 \pm 1,05	9,25 \pm 1,38	7,70 \pm 1,54	9,23 \pm 1,30	7,71 \pm 1,11
	K	13,36 ^{6,80}	14,07 ^{9,25}	14,16 ^{7,70}	14,07 ^{9,23}	12,40 ^{7,71}
	r^2	0,995	0,998	0,995	0,998	0,995
<i>C. granulatus</i>	V_0	11,60 \pm 6,23	5,61 \pm 2,43	9,08 \pm 3,14	7,31 \pm 4,47	12,91 \pm 7,14
	V_{\max}	371,13 \pm 17,86	334,86 \pm 10,41**	365,25 \pm 23,84	327,27 \pm 11,03**	378,34 \pm 19,46
	Coeficiente de Hill	7,04 \pm 0,83	9,84 \pm 0,96	7,16 \pm 1,09	9,77 \pm 1,04	7,41 \pm 0,97
	K	23,24 ^{7,04}	23,13 ^{9,84}	23,96 ^{7,16}	23,14 ^{9,77}	23,21 ^{7,41}
	r^2	0,997	0,998	0,996	0,997	0,997
<i>G. cruentata</i>	V_0	596,06 \pm 254,12	256,14 \pm 100,33	391,20 \pm 149,19	155,31 \pm 58,35	422,46 \pm 161,46
	V_{\max}	6765,69 \pm 811,35	4366,15 \pm 281,65**	5178,47 \pm 1193,81	4319,92 \pm 240,67**	4739,90 \pm 479,25
	Coeficiente de Hill	13,04 \pm 6,10	14,63 \pm 3,48	13,29 \pm 4,03	11,34 \pm 1,40	12,03 \pm 4,11
	K	25,96 ^{13,04}	26,54 ^{14,63}	24,41 ^{13,29}	28,23 ^{11,34}	25,87 ^{12,03}
	r^2	0,987	0,993	0,994	0,997	0,989

* P < 0,05

** P < 0,01

6.2 – Experimentos de transporte utilizando hepatopâncreas

A partir dos dados obtidos (Figura 6 e Tabelas 3 e 5) aqui apresentados, pôde-se observar que a cinética do transporte de Ca^{2+} em fase de intermuda e pós-muda utilizando os diferentes inibidores em hepatopâncreas de *Sesarma rectum* e *Chasmagnathus granulatus* (concentração de Ca^{2+} 0 – 20 mM), seguem a cinética de Michaelis-Menten, com um componente de difusão:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_M + S} + D, \text{ onde } V_{\max} \text{ corresponde à velocidade máxima da reação, } S$$

corresponde ao substrato, D corresponde ao componente de difusão e K_M à constante de Michaelis-Menten.

Os dados obtidos (Figura 6 e Tabelas 4 e 6) em *Goniopsis cruentata* (concentrações de Ca^{2+} 0 – 40 mM), não seguem uma cinética típica de Michaelis-Menten, mas de maneira semelhante ao observado em brânquias, seguem uma curva de cinética sigmoidal de Hill com 3 parâmetros :

- Curva de cinética sigmoidal de Hill com 3 parâmetros:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot S^h}{K^h + S^h}, \text{ onde } V_{\max} \text{ corresponde à velocidade máxima na qual ocorre a reação, } S$$

corresponde à concentração do substrato, K corresponde às constantes de afinidade do sítio ativo pelo substrato e h corresponde ao coeficiente de Hill.

6.2.1 – Experimentos de transporte utilizando hepatopâncreas em fase de intermuda

Os resultados obtidos em experimentos de transporte de cálcio em hepatopâncreas de *Sesarma rectum*, *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* em fase de intermuda são mostrados na Figura 6:

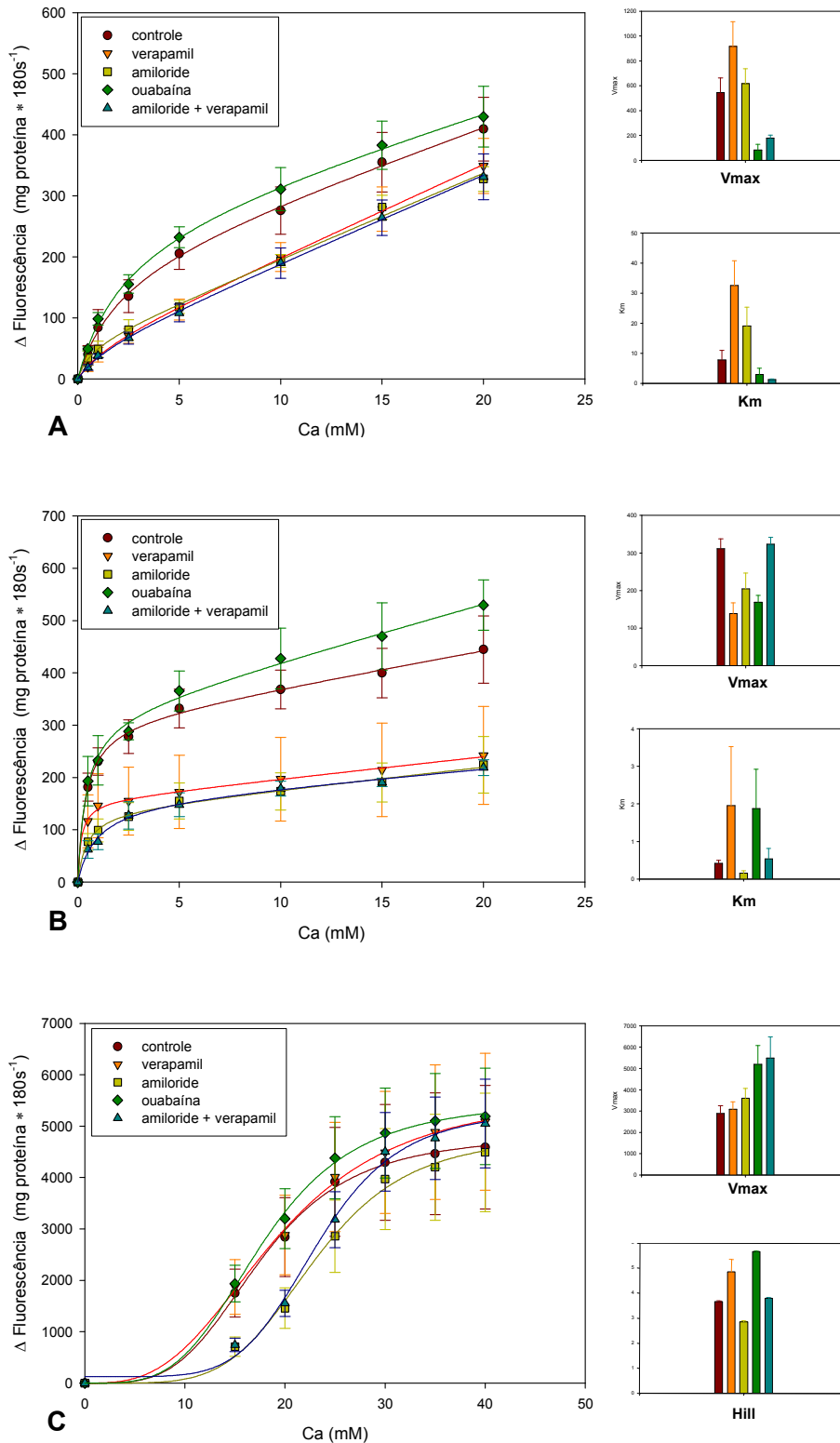


Figura 6: Mudança de fluorescência, V_{max} , K_m e Coeficiente de Hill em células de hepatopâncreas em intermuda, após a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} e a adição dos inibidores verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil em (A) *S. rectum*, (B) *C. granulata* e em (C) *G. cruentata* (média \pm erro padrão, N = 4).

Para *S. rectum* e *C. granulatus* em hepatopâncreas em fase de intermuda, em relação ao parâmetro V_{max} , os tratamentos com os inibidores amiloride, verapamil e os inibidores amiloride e verapamil conjugados promoveram uma redução nos valores obtidos (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 6; Tabela 3). Já o tratamento com o inibidor ouabaína promoveu um aumento nos valores de V_{max} em *S. rectum* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 6; Tabela 3). Quando comparadas as espécies, *C. granulatus* apresentou valores aproximadamente 2 vezes maiores do que os observados em *S. rectum* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 6; Tabela 3), no entanto não houve interação entre os tratamentos e as espécies.

Em relação à constante de Michaelis-Menten (K_m) em fase de intermuda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 6; Tabela 3). Também não foram observadas diferenças significativas entre as espécies *S. rectum* e *C. granulatus* (ANOVA, $P > 0,05$).

Em relação ao componente de difusão (D) em fase de intermuda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 6; Tabela 3). Quando comparadas as diferentes espécies, *S. rectum* apresentou valores 2 vezes maiores em relação a *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 6; Tabela 3).

Como observado anteriormente, os resultados obtidos em *S. rectum* e *C. granulatus* em intermuda apresentaram um padrão de cinética de Michaelis-Menten, no entanto, o padrão observado em *G. cruentata* foi o de cinética cooperativa de Hill (Figura 6 ; Tabelas 3 e 4).

Para *G. cruentata*, em relação ao parâmetro V_{max} , os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 6; Tabela 4).

Para Coeficiente de Hill em fase de intermuda, em relação aos tratamentos utilizados, o inibidor amiloride promoveu um aumento estatisticamente significativo (ANOVA, $P < 0,05$; Figura 6; Tabela 4) nos valores obtidos. O inibidor verapamil promoveu uma redução estatisticamente significativa (ANOVA, $P < 0,05$; Figura 6; Tabela 4) e o uso dos inibidores amiloride e verapamil conjugados promoveram um aumento estatisticamente significativo nos valores obtidos (ANOVA, $P < 0,05$; Figura 6; Tabela 4). Já o tratamento com o inibidor ouabaína não promoveu alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 6; Tabela 4).

Tabela 3: Parâmetros de cinética tipo Michaelis-Menten em células de hepatopâncreas em fase de intermuda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-40mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão)

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>S. rectum</i>	V_{\max}	202.10 \pm 26.13	55.16 \pm 10.45**	58.07 \pm 16.48**	51.92 \pm 8.08**	264.84 \pm 25.06**
	K_m	1,22 \pm 0.50	1.64 \pm 0.64	0.67 \pm 0,57	1.52 \pm 0.50	2.29 \pm 0.39
	D	11.40 \pm 1.19	14.98 \pm 0.51	14.01 \pm 0.98	14.27 \pm 0.40	9.79 \pm 1.09
	r^2	0.998	0.999	0.996	0.999	0.998
<i>C. granulatus</i>	V_{\max}	311,57 \pm 15,37	139,08 \pm 13,33**	204,92 \pm 14,51**	169,06 \pm 25,69**	323,25 \pm 35,10
	K_m	0,41 \pm 0,08	1,95 \pm 0,14	0,15 \pm 0,03	1,87 \pm 0,84	0,53 \pm 0,14
	D	6,81 \pm 0,97	4,17 \pm 0,59	5,97 \pm 1,03	2,85 \pm 1,07	10,83 \pm 1,64
	r^2	0,995	0,989	0,984	0,989	0,971

** P < 0,001

Tabela 4: Parâmetros de cinética tipo sigmoidal em células de hepatopâncreas de *G. cruentata* em fase de intermuda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-40mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão).

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>G. cruentata</i>	V_{\max}	2886,19 \pm 68,96	3081,44 \pm 349,45	3599,45 \pm 390,51	5190,13 \pm 382,34	5483,14 \pm 194,28
	Coefficiente de Hill	3,65 \pm 0,23	4,84 \pm 1,19*	2,84 \pm 0,61*	5,64 \pm 0,97*	3,78 \pm 0,36
	K	17,86 ^{3,65}	24,10 ^{4,84}	20,15 ^{2,84}	18,03 ^{5,64}	17,87 ^{3,78}
	r^2	0,999	0,990	0,994	0,994	0,998

* P < 0,05

6.2.2 – Experimentos de transporte utilizando hepatopâncreas em fase de pós-muda

Os resultados obtidos em experimentos de transporte de cálcio em hepatopâncreas de *Sesarma rectum*, *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* em fase de pós-muda se encontram na Figura 7:

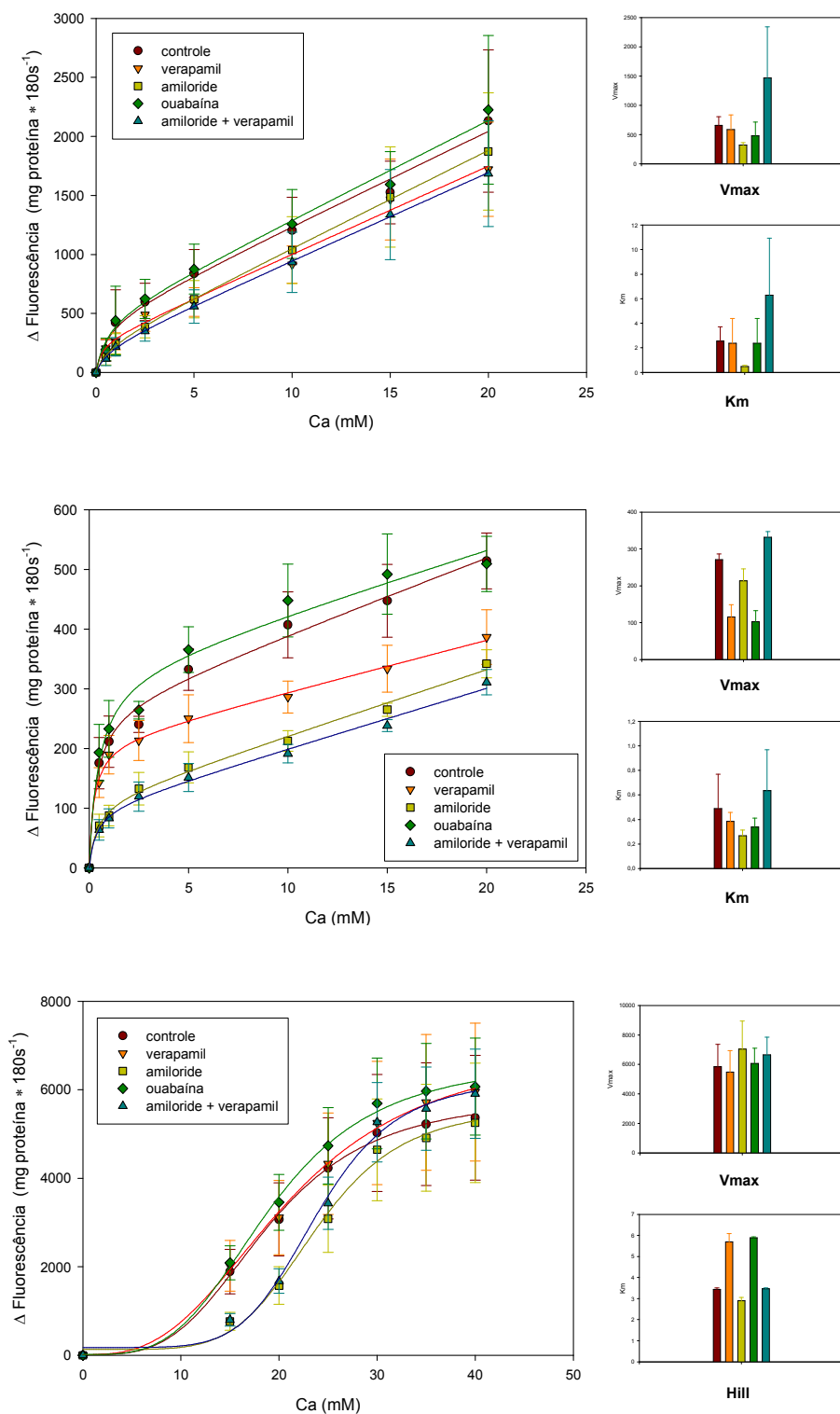


Figura 7: Mudança de fluorescência, V_{max} , K_m e coeficiente de Hill em células de hepatopâncreas em pós-muda, após a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} e a adição dos inibidores verapamil, amiloride, ouabaina e amiloride junto com verapamil em (A) *S. rectum*, (B) *C. granulata* e em (C) *G. cruentata* (média \pm erro padrão, N = 4).

Para *S. rectum* e *C. granulatus* em hepatopâncreas em fase de pós-muda, em relação ao parâmetro V_{max} , os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 7; Tabela 5). Quando comparadas as espécies, *S. rectum* apresentou valores de V_{max} 2 vezes maiores em relação à *C. granulatus* (ANOVA, $P > 0,01$; Figura 7; Tabela 5).

Em relação à constante de Michaelis-Menten (K_m) em fase de intermuda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figuras 13 e 14; Tabela 5). Quando comparadas às espécies, *S. rectum* apresentou valores 5 vezes maiores em relação à *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,05$).

Em relação ao componente de difusão (D) em fase de pós-muda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 7; Tabela 5). Quando comparadas as espécies, *S. rectum* apresentou valores 7 vezes maiores em relação a *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 7; Tabela 5)

Como observado anteriormente, os resultados obtidos em *S. rectum* e *C. granulatus* em intermuda apresentaram um padrão de cinética de Michaelis-Menten, no entanto, o padrão observado em *G. cruentata* foi o de cinética cooperativa de Hill (Figura 7; Tabela 6).

Para *G. cruentata*, em relação ao parâmetro V_{max} , os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 7; Tabela 6).

Para o Coeficiente de Hill em fase de pós-muda, o inibidor amiloride promoveu um aumento estatisticamente significativo (ANOVA, $P < 0,05$; Figura 7; Tabela 6) e o uso dos inibidores amiloride e verapamil conjugados promoveram um aumento estatisticamente significativo nos valores obtidos (ANOVA, $P < 0,05$; Figura 7; Tabela 6). Já o tratamento com o inibidor ouabaína não promoveu alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 7; Tabela 6).

Tabela 5: Parâmetros de cinética tipo Michaelis-Menten em células de hepatopâncreas em fase de pós-muda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-40mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão)

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>S. rectum</i>	V_{\max}	659,06 \pm 258,63	585,11 \pm 178,19	321,72 \pm 98,53	480,85 \pm 295,37	1472,12 \pm 421,28
	K_m	2,53 \pm 0,50	2,38 \pm 0,78	0,46 \pm 0,22	2,38 \pm 0,53	6,28 \pm 2,03
	D	86,80 \pm 15,40	75,08 \pm 4,68	73,85 \pm 6,92	67,58 \pm 4,61	68,65 \pm 12,58
	r^2	0,963	0,993	0,984	0,993	0,963
<i>C. granulatus</i>	V_{\max}	270,93 \pm 51,90	115,88 \pm 15,29	213,43 \pm 27,81	102,80 \pm 13,40	332,23 \pm 67,24
	K_m	0,48 \pm 0,25	0,38 \pm 0,25	0,26 \pm 0,18	0,33 \pm 0,11	0,63 \pm 0,58
	D	12,73 \pm 3,12	10,91 \pm 0,99	7,75 \pm 1,63	9,97 \pm 0,88	10,49 \pm 3,28
	r^2	0,971	0,991	0,976	0,991	0,962

Tabela 6: Parâmetros de cinética tipo sigmoidal em células de hepatopâncreas de *G. cruentata* em fase de pós-muda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-40mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão).

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>G. cruentata</i>	V_{\max}	5848,91 \pm 347,69	5481,68 \pm 535,49	7039,25 \pm 676,12	6067,53 \pm 523,31	6653,35 \pm 357,41
	Coeficiente de Hill	3,43 \pm 0,49	5,69 \pm 1,27*	2,90 \pm 0,48	5,89 \pm 1,19*	3,47 \pm 0,44
	K	19,09 ^{3,43}	23,87 ^{5,69}	21,38 ^{2,90}	23,93 ^{5,89}	19,21 ^{3,47}
	r^2	0,996	0,99	0,996	0,993	0,997

* P < 0,05

6.3 – Experimentos de transporte utilizando glândula antenal

A partir dos dados obtidos (Figura 8 e Tabelas 7 e 8), pôde-se observar que a cinética do transporte de Ca^{2+} em fase de intermuda e pós-muda utilizando os diferentes inibidores em glândula antenal de *Sesarma rectum*, *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* (concentração de Ca^{2+} 0 – 2,5 mM), seguem a cinética de Michaelis-Menten, com um componente de difusão:

$$V_0 = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_M + S} + D, \text{ onde } V_{\max} \text{ corresponde à velocidade máxima da reação, } S$$

corresponde ao substrato, D corresponde ao componente de difusão e K_M à constante de Michaelis-Menten.

6.3.1 – Experimentos de transporte utilizando glândula antenal em fase de intermuda

Os resultados obtidos em experimentos de transporte de cálcio em glândula antenal de *Sesarma rectum*, *Chasmagnathus granulatus* e *Goniopsis cruentata* em fase de intermuda encontram-se na Figura 8:

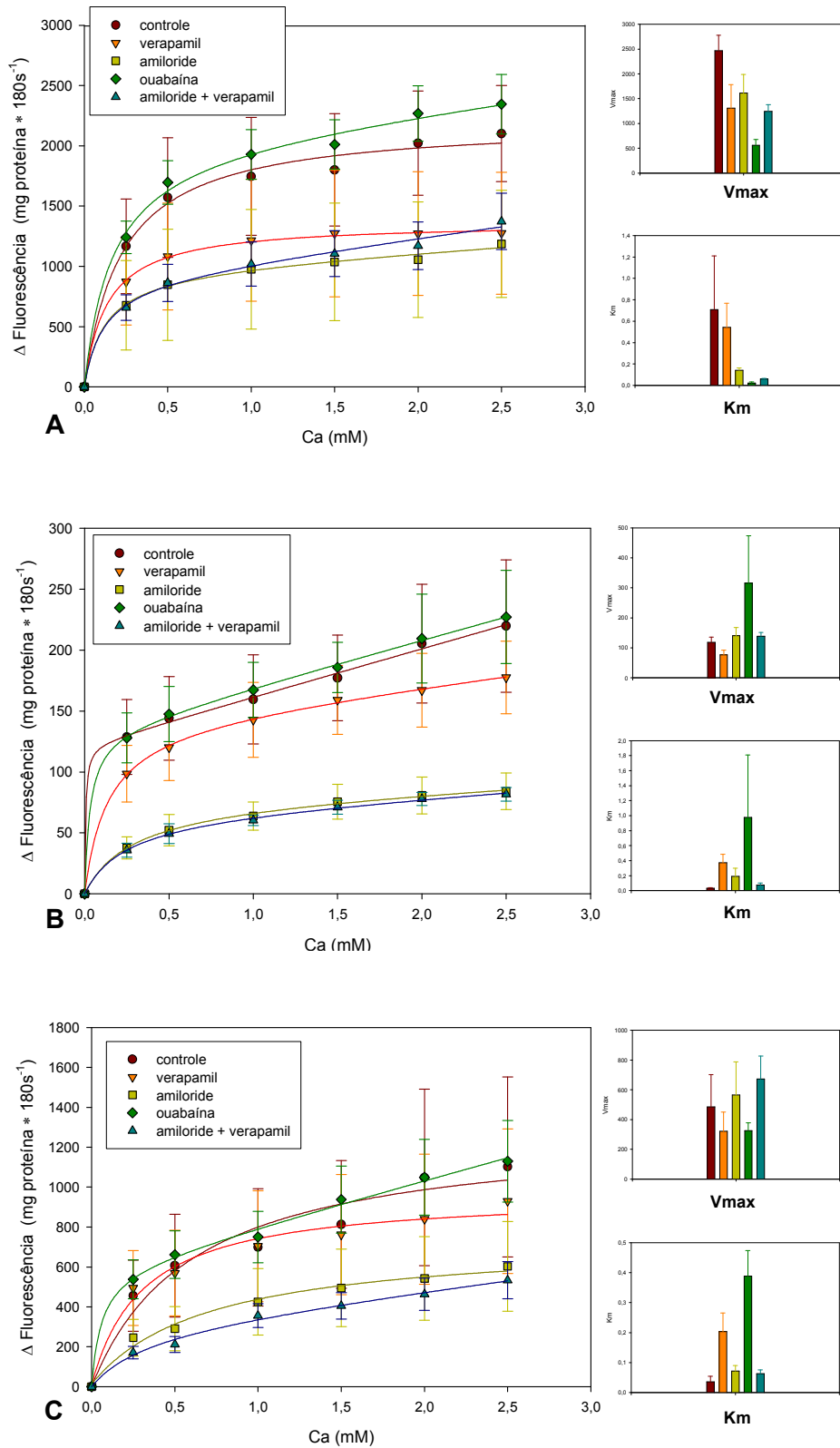


Figura 8: Mudança de fluorescência, V_{max} e K_m em células de glândula antenal em intermuda, após a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} e a adição dos inibidores verapamil, amiloride, ouabaina e amiloride junto com verapamil em (A) *S. rectum*, (B) *C. granulata* e em (C) *G. cruentata* (média \pm erro padrão, N = 4).

Para o parâmetro V_{max} de glândula antenal em fase de intermuda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas para nenhum dos caranguejos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 8; Tabela 7). Quando comparadas as espécies, *S. rectum* apresentou valores de V_{max} 4 vezes maiores em relação à *C. granulatus* e *G. cruentata* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 8; Tabela 7).

Em relação à constante de Michaelis-Menten (K_m), os tratamentos utilizados também não promoveram alterações estatisticamente significativas para nenhum dos caranguejos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 8; Tabela 7). Quando comparadas as espécies, não foram observadas diferenças significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 8; Tabela 7).

Em relação ao componente de difusão (D) em fase de intermuda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 8; Tabela 7). Quando comparadas, as espécies *S. rectum* e *G. cruentata* apresentaram valores 7 vezes maiores em relação à *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,001$).

Tabela 7: Parâmetros de cinética tipo Michaelis-Menten em células de glândula antenal em fase de intermuda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-2,5mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão)

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaina
<i>S. rectum</i>	V_{max}	1825.94 \pm 201.01	979.21 \pm 88.44	1478.59 \pm 20.96	910.28 \pm 123.70	2044.97 \pm 219.28
	K_m	0.14 \pm 0.04	0.11 \pm 0.03	0.16 \pm 0.0068	0.11 \pm 0.05	0.16 \pm 0.05
	D	143.25 \pm 77.75	88.07 \pm 35.05	43.84 \pm 7.84	182.57 \pm 49.50	167.61 \pm 82.54
	r^2	0.995	0.998	0.999	0.997	0.996
<i>C. granulatus</i>	V_{max}	118,02 \pm 11,60	76,94 \pm 13,81	140,21 \pm 12,97	315,65 \pm 14,96	138,28 \pm 21,42
	K_m	0,03 \pm 0,01	0,37 \pm 0,14	0,19 \pm 0,04	0,97 \pm 0,32	0,07 \pm 0,03
	D	34,07 \pm 5,15	5,40 \pm 2,25	14,57 \pm 3,25	17,31 \pm 5,86	36,55 \pm 8,65
	r^2	0,994	0,991	0,997	0,991	0,989
<i>G. cruentata</i>	V_{max}	485,71 \pm 129,07	321,19 \pm 85,83	564,60 \pm 50,29	325,15 \pm 93,06	673,05 \pm 84,82
	K_m	0,03 \pm 0,08	0,20 \pm 0,08	0,07 \pm 0,04	0,38 \pm 0,15	0,06 \pm 0,04
	D	258,10 \pm 54,89	98,04 \pm 29,47	144,07 \pm 21,213	99,43 \pm 24,93	257,25 \pm 36,33
	r^2	0,99	0,992	0,994	0,991	0,995

6.3.2 – Experimentos de transporte utilizando glândula antenal em fase de pós-muda

Os resultados obtidos em experimentos de transporte de cálcio em *Sesarma rectum* em glândula antenal em fase de pós-muda se encontram na Figura 9:

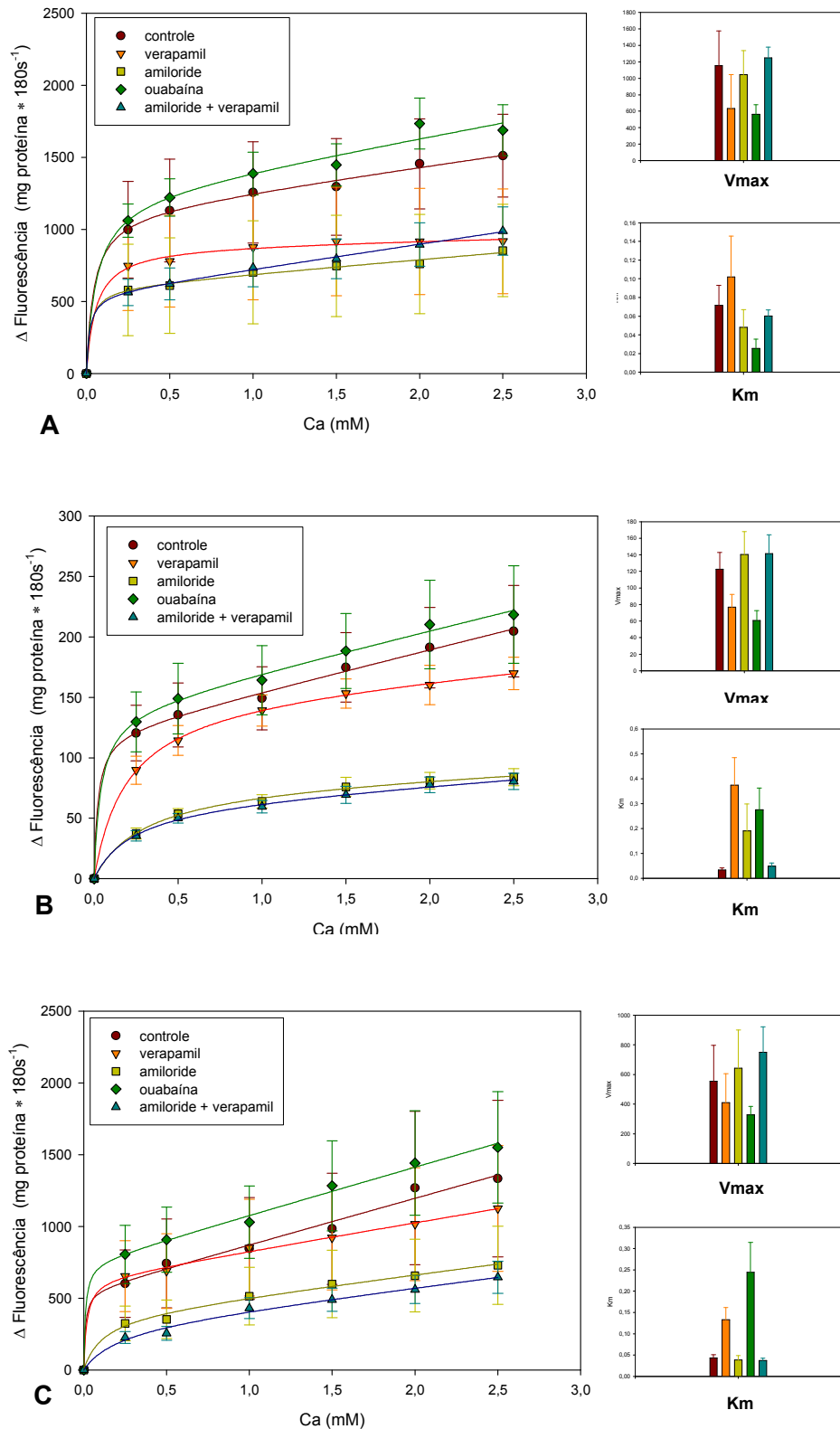


Figura 9: Mudança de fluorescência, V_{max} e K_m em células de glândula antenal em pós-muda, após a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} e a adição dos inibidores verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil em (A) *S. rectum*, (B) *C. granulata* e em (C) *G. cruentata* (média \pm erro padrão, N = 4).

Para o parâmetro V_{\max} de glândula antenal em fase de pós-muda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas para nenhum dos caranguejos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 9; Tabela 8). Quando comparadas, as 3 espécies utilizadas neste estudo apresentaram diferenças significativas em relação aos valores obtidos de V_{\max} (ANOVA, $P < 0,001$), onde *S. rectum* apresentou valores 1,7 vezes maiores que os observados em *G. cruentata* e 9 vezes maiores que em *C. granulatus*.

Em relação à constante de Michaelis-Menten (K_m) em fase de pós-muda, o inibidor amiloride promoveu um aumento nos valores obtidos nas 3 espécies estudadas, sendo estatisticamente significativo em *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 9; Tabela 8). Já o uso dos inibidores amiloride e verapamil conjugados promoveram uma redução nos valores obtidos em *S. rectum* e promoveram um aumento estatisticamente significativo em *C. granulatus* e *G. cruentata* (ANOVA, $P < 0,001$; Figura 9; Tabela 8). Quando comparadas às espécies, *C. granulatus* apresentou valores 2 vezes maiores em relação à *S. rectum* e *G. cruentata* (ANOVA, $P > 0,05$). Houve interação entre tratamento e espécie, mostrando que em *S. rectum*, o inibidor amiloride e verapamil conjugados não promoveram aumento em relação ao controle, resultado diferente do observado na espécie *C. granulatus* quando submetida ao tratamento com esses inibidores.

Em relação ao componente de difusão (D) em fase de pós-muda, os tratamentos utilizados não promoveram alterações estatisticamente significativas para nenhum dos caranguejos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 9; Tabela 8). Quando comparadas as 3 espécies utilizadas neste estudo, estas apresentaram diferenças significativas em relação aos valores obtidos de D (ANOVA, $P < 0,001$), onde *G. cruentata* apresentou valores 1,6 vezes maiores que em *S. rectum* e 11 vezes maiores que os observados em *C. granulatus*.

Tabela 8: Parâmetros de cinética tipo Michaelis-Menten em células de glândula antenal em fase de pós-muda com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-2,5mM) e dos inibidores: verapamil, amiloride, ouabaína e amiloride junto com verapamil (média \pm erro padrão)

Espécie	Parâmetros	Controle	Amiloride	Verapamil	Amiloride + Verapamil	Ouabaína
<i>S. rectum</i>	V_{\max}	1151,35 \pm 97,91	633,83 \pm 57,21	1042,57 \pm 75,67	561,20 \pm 27,63	1247,36 \pm 170,57
	K_m	0,07 \pm 0,03	0,10 \pm 0,05	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,007 ^b	0,060 \pm 0,05
	D	154,29 \pm 42,62	114,95 \pm 27,14	52,78 \pm 11,15	170,86 \pm 12,53	207,86 \pm 72,91
	r^2	0,991	0,980	0,996	0,998	0,990
<i>C. granulatus</i>	V_{\max}	122,52 \pm 11,62	76,93 \pm 13,81	140,21 \pm 12,97	60,60 \pm 10,04	141,38 \pm 14,89
	K_m	0,03 \pm 0,01	0,37 \pm 0,09***	0,19 \pm 0,04	0,27 \pm 0,11***	0,04 \pm 0,02
	D	34,07 \pm 5,15	5,78 \pm 2,63	14,57 \pm 3,25	8,50 \pm 3,39	33,13 \pm 6,45
	r^2	0,994	0,991	0,997	0,993	0,993
<i>G. cruentata</i>	V_{\max}	554,75 \pm 129,37	411,16 \pm 93,59	642,75 \pm 58,30	329,05 \pm 124,95	749,70 \pm 85,70
	K_m	0,04 \pm 0,01	0,13 \pm 0,06	0,03 \pm 0,01	0,24 \pm 0,12***	0,03 \pm 0,006
	D	322,26 \pm 58,09	139,16 \pm 35,77	194,25 \pm 26,24	138,03 \pm 34,42	333,39 \pm 39,22
	r^2	0,990	0,989	0,994	0,990	0,995

*** P < 0,001

b (interação tratamento / espécie)

6.4 – Resultados obtidos em relação às espécies e os estágios de intermuda e pós-muda

Foram comparadas as espécies em relação ao efeito do estágio do ciclo de muda somente em relação aos valores de controle, e foram observados parâmetros que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura 10; Tabelas 8, 9 e 10)

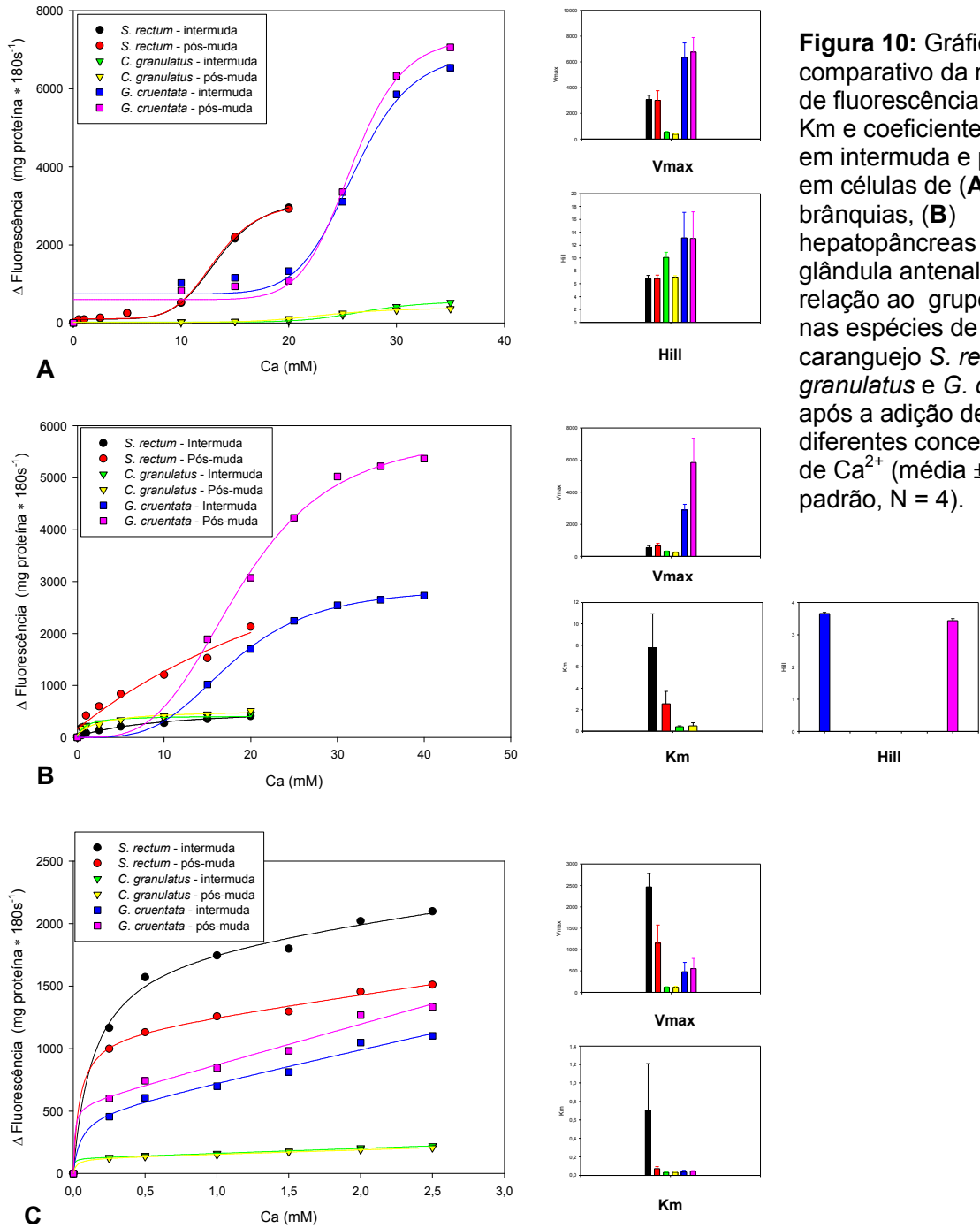


Figura 10: Gráfico comparativo da mudança de fluorescência, V_{max} , K_m e coeficiente de Hill em intermuda e pós-muda em células de (A) brânquias, (B) hepatopâncreas e (C) glândula antenal em relação ao grupo controle nas espécies de caranguejo *S. rectum*, *C. granulatus* e *G. cruentata*, após a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (média \pm erro padrão, N = 4).

No coeficiente de Hill em brânquias não foram observadas diferenças entre os estágios de muda (Figura 10; Tabela 9), nem para V_0 e nem para V_{max} .

No parâmetro V_{max} de hepatopâncreas em *C. granulatus* foi observada a ocorrência da interação espécie / estágio (ANOVA, $P < 0,05$), enquanto *S. rectum* apresentou um aumento de aproximadamente 5,5 vezes nos valores observados no estágio de pós-muda em relação à intermuda (Figura 10; Tabela 9).

O parâmetro V_{max} de hepatopâncreas em *G. cruentata* não apresentou diferenças entre pós-muda e intermuda (Figura 10; Tabela 10), porém houve uma diminuição no coeficiente de Hill durante a pós-muda (ANOVA, $P > 0,05$).

Já no coeficiente de difusão (D) de hepatopâncreas em *S. rectum* e *C. granulatus* foi observado um aumento de 7,1 vezes na pós-muda para *S. rectum* e 1,6 vezes no estágio de pós-muda para *C. granulatus* (ANOVA, $P < 0,01$). Também foi observada a interação espécie / estágio (ANOVA, $P < 0,001$), onde *S. rectum* apresentou um aumento nos valores do D de aproximadamente 5,2 vezes no estágio de pós-muda (Figura 10; Tabela 10).

Em glândula antenal não foi observada a ocorrência de interação espécie / estágio nas diferentes espécies estudadas e nem efeito dos diferentes estágios em relação aos parâmetros cinéticos (ANOVA, $P > 0,05$; Figura 10; Tabela 11).

Tabela 9: Parâmetros de cinética tipo sigmoidal em células de brânquias em fase de intermuda e pós-muda em experimento controle com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-20mM) (média \pm erro padrão)

Espécie	<i>S. rectum</i>		<i>C. granulatus</i>		<i>G. cruentata</i>	
	intermuda	pós-muda	intermuda	pós-muda	intermuda	pós-muda
V_0	125,32 \pm 47,10	107,24 \pm 41,89	21,17 \pm 8,97	11,60 \pm 6,23	596,01 \pm 213,15	596,06 \pm 254,12
V_{max}	2994,58 \pm 165,44	3008,79 \pm 197,09	527,12 \pm 40,26	371,13 \pm 17,86 ^b	6353,41 \pm 1303,16	6765,69 \pm 811,35
Coeficiente de Hill	6,52 \pm 0,88	6,80 \pm 1,05	10,08 \pm 1,94	7,04 \pm 0,83 ^a	13,15 \pm 6,67	13,04 \pm 6,10
K	13,17 ^{6,52}	13,36 ^{6,80}	26,57 ^{10,08}	23,24 ^{7,04}	26,32 ^{13,15}	25,96 ^{13,04}
r^2	0,996	0,995	0,995	0,997	0,977	0,987

a (interação espécie / estágio)

b (interação tratamento / espécie)

Tabela 10: Parâmetros de cinética tipo Michaelis-Menten e do tipo sigmoidal em células de hepatopâncreas em fase de intermuda em experimento controle com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-40mM) (média \pm erro padrão)

Espécie	<i>S. rectum</i>		<i>C. granulatus</i>		<i>G. cruentata</i>	
	intermuda	pós-muda	intermuda	pós-muda	intermuda	pós-muda
V_{max}	183,54 \pm 48,36	659,06 \pm 258,63 ^{a*}	311,57 \pm 15,37	270,93 \pm 51,90 ^a	2886,19 \pm 68,96	5848,91 \pm 347,69
K_m	1,22 \pm 0,50	2,53 \pm 0,50 [*]	0,41 \pm 0,08	0,48 \pm 0,25 [*]	-----	-----
D	12,69 \pm 2,49	86,80 \pm 15,40 ^{a**}	6,817 \pm 0,97	12,73 \pm 3,12 ^{**}	-----	-----
Coefficiente de Hill	-----	-----	-----	-----	3,65 \pm 0,07	3,43 \pm 0,13 [*]
K	-----	-----	-----	-----	17,86 ^{3,65}	19,09 ^{3,43}
r²	0,998	0,963	0,995	0,971	0,999	0,996

a (interação espécie / estágio)

* P < 0,05

** P < 0,01

Tabela 11: Parâmetros de cinética tipo Michaelis-Menten em células de glândula antenal em fase de intermuda e pós-muda em experimento controle com a adição de diferentes concentrações de Ca^{2+} (0-2,5mM) (média \pm erro padrão)

Espécie	<i>S. rectum</i>		<i>C. granulatus</i>		<i>G. cruentata</i>	
	intermuda	pós-muda	intermuda	pós-muda	intermuda	pós-muda
V_{max}	1868,90 \pm 682,64	1151,35 \pm 97,91	118,02 \pm 11,60	122,52 \pm 11,62	485,71 \pm 129,07	554,75 \pm 129,37
K_m	0,14 \pm 0,04	0,07 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,08	0,04 \pm 0,01
D	78,02 \pm 11,45	154,29 \pm 42,62	34,07 \pm 5,15	34,07 \pm 5,15	258,10 \pm 54,89	322,26 \pm 58,09
r²	0,995	0,991	0,994	0,994	0,99	0,990

7 – Discussão

Os crustáceos são um modelo animal ideal para estudar o transporte epitelial de Ca^{2+} em virtude do exoesqueleto, mineralizado com CaCO_3 e que deve ser trocado para permitir o crescimento do animal por meio do ciclo de muda (GREENAWAY, 1985; WHEATLY, 1996, 1997). A natureza cíclica da desmineralização (pré-muda) / re-mineralização (pós-muda) requer que os epitélios primários de transporte de Ca^{2+} (brânquias, hepatopâncreas, glândula antenal e hipoderme) operem alternadamente na função de absorção e secreção; o que contrasta grandemente com o período de intermuda, onde o transporte epitelial de Ca^{2+} é mínimo.

A partir das análises dos resultados obtidos pôde-se verificar algumas hipóteses sobre os processos de homeostase do Ca^{2+} em crustáceos semi-terrestres. Segue-se a discussão dos efeitos dos inibidores em fase de intermuda e pós-muda nas espécies estudadas para cada um dos tecidos utilizados.

7.1 – Transporte de Ca^{2+} em brânquias

Em brânquias de *S. rectum*, as concentrações de Ca^{2+} utilizadas (0 – 20 mM) foram suficientes para a saturação dos transportadores de Ca^{2+} , no entanto, em *C. granulatus* e em *G. cruentata* foi necessário a utilização de uma concentração de Ca^{2+} maior (0 – 35 mM) para que os transportadores fossem saturados, o que talvez reflita o hábitat das espécies estudadas, onde *S. rectum* e *G. cruentata* apresentam nível T_3 de terrestrialidade, enquanto que *C. granulatus* apresenta nível T_2 (BURGREEN & MACMAHON, 1988). Apesar de *S. rectum* e *G. cruentata* apresentarem o mesmo nível de terrestrialidade, *G. cruentata* geralmente também habita as regiões mais úmidas do mangue, quando comparado a *S. rectum*, o que explicaria a necessidade de uma concentração maior de Ca^{2+} para a saturação dos trocadores, uma vez que em uma região com maior disponibilidade de água, o acesso/disponibilidade do íon Ca^{2+} pode ser maior. Portanto, *S. rectum* apresentaria uma adaptação fisiológica, no caso uma maior afinidade dos trocadores de Ca^{2+} em brânquias para compensar a menor disponibilidade deste íon no meio ambiente.

De acordo com os resultados obtidos em brânquias em fase de intermuda, foram observadas alterações significativas somente no parâmetro V_0 nas espécies estudadas com a utilização do inibidor ouabaína em *G. cruentata* que apresentou um aumento significativo nos valores observados quando comparados ao controle (aumento de aproximadamente 1,3 vezes) e com a utilização dos inibidores amiloride + verapamil conjugados em *S. rectum* e *G. cruentata*, que apresentaram uma redução significativa nos valores observados quando comparados ao controle (redução de aproximadamente 2,1 vezes e 2,9 vezes, respectivamente). Os demais tratamentos demonstraram uma tendência a promover redução nos valores obtidos, mas, no entanto, não foram significativos (ver Tabela 1).

De acordo com TOWLE (1993), o transporte (absorção) do Na^+ em brânquias de crustáceos se dá pela atividade da Na^+/K^+ ATPase presente na membrana basolateral do epitélio branquial. Esta enzima transporta íons Na^+ para fora da célula, criando uma baixa concentração intracelular de Na^+ . O gradiente eletroquímico resultante no interior da célula “direciona” a entrada de Na^+ pela região apical via canais de Na^+ ou trocadores Na^+/H^+ ou $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$. Altos níveis de atividade da Na^+/K^+ ATPase estão presentes no epitélio branquial da maioria dos crustáceos (ver revisão em PEQUEUX, 1995). LUCU e SIEBERS (1987) e ONKEN e SIEBERS e colaboradores (1992) demonstraram o envolvimento da Na^+/K^+ ATPase na absorção de NaCl_2 em brânquias de *Carcinus maenas*, a partir da inibição (dose-dependente) da absorção de NaCl_2 pela ouabaína – inibidor específico da Na^+/K^+ ATPase (SKOU, 1965).

Experimentos eletrofisiológicos conduzidos por RIESTENPATT e colaboradores (1996) em epitélio de brânquias de *Carcinus maenas* indicaram que a ouabaína afetou a condutância do epitélio branquial quando utilizado em altas doses (10 mmol^1), reduzindo significativamente a condutância de $34 \pm 9 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ para $32 \pm 7 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-2}$. Inibiu, também, completamente as correntes negativas de curto-circuito (I_{sc}), onde a inibição da metade do I_{sc} máximo pela ouabaína na região basolateral está de acordo com a constante de inibição da ouabaína observada em brânquias de *Eriocheir sinensis* (GRASZYNSKI & BIGALKI, 1986; SCHWARZ & GRASZYNSKI, 1990), outras espécies de crustáceos (WANSON *et al.*, 1984; D'ORARIO & HOLLIDAY, 1985; GRASZYNSKI & BIGALKI, 1986) e *Callinectes sapidus* (NEUFELD *et al.*, 1980). LUCU e colaboradores (1989), também observaram que uma concentração relativamente alta de ouabaína é necessária para superar as vias de difusão para os sítios sensíveis à ouabaína. Os valores de K_i (0,46-0,82 mM) para o inibidor ouabaína observados em

brânquias de *C. granulatus* são similares aos observados para outros crustáceos (TOWLE, 1984; HOLLIDAY, 1985; COROTTO & HOLLIDAY, 1996; LUCU & DEVESCOVI, 1999) e também estão de acordo com a sensibilidade da Na^+/K^+ ATPase a este inibidor ao longo de outros grupos taxonômicos, como por exemplo, a ocorrência de maior sensibilidade a ouabaína ($K_i \approx 10 \mu\text{M}$) em quelicerados em relação aos crustáceos ($K_i \approx 100 \mu\text{M}$). NEUFELD e colaboradores (1980) demonstraram que a Na^+/K^+ ATPase em vertebrados são muito mais sensíveis à ouabaína que a de crustáceos braquiúros (CASTILHO *et al.*, 2001). Experimentos utilizando brânquias de *C. granulatus*, mostraram uma ação inibitória da ouabaína em concentrações maiores que 100 mmol l^{-1} (SIEBERS *et al.*, 1982; PÉQUEUX *et al.*, 1984; HARRIS & BAYLISS, 1988; CASTILHO *et al.*, 2001). CASTILHO e colaboradores (2001) também comentam que uma alta concentração intracelular de Na^+ possa ser um fator modulador da atividade enzimática em brânquias de *C. granulatus* (CASTILHO *et al.*, 2001).

Já em estágio de pós-muda o parâmetro que sofreu alteração com os tratamentos utilizados foi o V_{max} , onde os tratamentos utilizando o inibidor verapamil não causaram mudanças no V_{max} , mas os inibidores amiloride e amiloride + verapamil conjugados promoveram redução nos valores obtidos em relação ao controle (Tabela 2). Resultado esperado segundo WHEATLY e colaboradores (2001) e DE LA PENA e REEVS, (1987), que utilizaram inibidores do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ incluindo o amiloride e seus derivados. O fato de não haver diferença significativa entre os resultados obtidos entre os tratamentos com os inibidores amiloride e amiloride + verapamil conjugados se deve ao fato de o inibidor do canal de Ca^{2+} verapamil não ter causado alterações estatisticamente significativas onde, provavelmente, as concentrações utilizadas não foram suficientes para tal (apesar de nitidamente promoverem uma tendência à redução nos valores de V_{max}).

Segundo WHEATLY (2001), uma grande variedade de compostos farmacêuticos têm sido utilizados como inibidores do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, incluindo o amiloride, que compete com o Na^+ em canais de Na^+ e em trocadores Na^+/H^+ , e onde concentrações de $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, devem bloquear ambos os mecanismos. Porém, o amiloride e seus derivados pode também ocasionar um efeito estimulatório no transporte de cálcio, dependendo do lado da membrana a que o inibidor se liga (DE LA PENA & REEVS, 1987). Provavelmente, o aumento ou redução da concentração intracelular de Ca^{2+} depende da proporção de trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ entre a região apical e a região basolateral nas células, e o resultado final observado com a utilização de inibidores em pós-muda foi uma redução no transporte total de cálcio, enquanto que em

intermuda o efeito observado foi o oposto. Segundo ZANOTTO & WHEATLY (2003), na região basolateral de células hepatopancreáticas foi observado que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ possui uma estrutura que permite suportar aumentos na sua capacidade de transporte sem proliferação ou ativação de proteínas adicionais.

Os resultados sugerem que os transportadores de Ca^{2+} nas células de brânquias nas espécies estudadas obedecem a uma cinética cooperativa (TIPTON, 1992; EISENTHAL & DANSON, 1992), onde os valores de V_{max} em *C. granulatus* foram aproximadamente 6 vezes menores que os observados em *S. rectum* e 12 vezes em *G. cruentata*. Esses resultados já eram esperados, já que *C. granulatus* apresenta um menor nível de terrestrialidade em relação ao *S. rectum* e *G. cruentata* (ver MELO, 1996), o que implicaria em maior disponibilidade de íons (no caso Ca^{2+}) e, conseqüentemente menor capacidade dos trocadores pelo Ca^{2+} .

O coeficiente de Hill não apresentou alterações significativas com relação aos tratamentos utilizados, mas sugerem o envolvimento de aproximadamente 5 a 8 sítios de ligação para Ca^{2+} nos transportadores em cooperação em *S. rectum*, de 6 a 11 em *C. granulatus* e de 6 a 16 em *G. cruentata*. Essa cinética sigmoideal havia sido observada anteriormente em brânquias isoladas do caranguejo *Carcinus* (LUCU, 1994), mas com valores do coeficiente de Hill menores, indicando que os valores do coeficiente observados em *S. rectum* estariam mais próximos da realidade.

As brânquias realizam os balanços iônico e osmótico através de trocas iônicas que estão intimamente associadas com a atividade de duas enzimas: a Na^+, K^+ -ATPase e a anidrase carbônica (MANTEL & FARMER, 1983). A Na^+, K^+ -ATPase é encontrada em grande quantidade nas membranas plasmáticas das células branquiais de crustáceos eurialinos, cuja atividade está diretamente ligada ao mecanismo de transporte ativo de Na^+ e K^+ . Sua atividade é geralmente maior nas brânquias transportadoras de sais (posteriores) do que nas brânquias respiratórias (anteriores). Vários estudos têm demonstrado diferenças na atividade da Na^+, K^+ -ATPase entre os diferentes pares de brânquias. A atividade dessa enzima é maior nas brânquias posteriores que nas anteriores em *Thalamita crenata* (SPENCER *et al.*, 1979), *Callinectes sapidus* (NEUFELD *et al.*, 1980), *Carcinus maenas* (SIEBERS *et al.*, 1982), *Eríocheir sinensis* (PÉQUEUX *et al.*, 1984), *Uca minax* (WANSON *et al.*, 1984), *Uca pugnax* (HOLLIDAY, 1985), *Ucides cordatus* (HARRIS & SANTOS, 1993) e *Chasmagnathus granulatus* (BIANCHINI & CASTILHO, 1999), quando aclimatados ao meio diluído. Durante o curso temporal de aclimação à baixa salinidade, várias

modificações nas atividades dessas enzimas podem ser observadas (HOLLIDAY, 1985; WHEATLY & HENRY, 1987; HENRY & WHEATLY, 1988; CASTILHO, 1996; BIANCHINI & CASTILHO, 1999). Diversos trabalhos têm sugerido que dois níveis de controle enzimático podem estar operando sobre a Na^+ , K^+ -ATPase branquial e a anidrase carbônica. O primeiro, a curto prazo, envolveria a ativação / inibição da enzima pré-existente, enquanto o segundo, a longo prazo, estaria baseado na síntese / degradação de novas unidades enzimáticas (para revisão: PÉQUEUX, 1995). Dentre os mecanismos envolvidos no balanço iônico e osmótico a curto prazo, ressaltamos também aqui a habilidade do epitélio branquial em reduzir a sua permeabilidade à água e aos íons durante os primeiros momentos após um choque hiposalino.

Como observado para outros caranguejos, o transporte ativo de sais é dependente da atividade da Na^+/K^+ ATPase presente nas brânquias para manter a hemolinfa hiperosmótica em um meio diluído. De fato, como reportado para outras espécies de crustáceos (D'ORAZIO & HOLLIDAY, 1985; HOLLIDAY, 1985; HARRIS & BAYLISS, 1988; COROTTO & HOLLIDAY, 1996), a atividade da Na^+/K^+ ATPase em *C. granulatus* é responsável pela maior parte (80%) da atividade das ATPases nas brânquias (CASTILHO *et al.*, 2001).

Uma possível inibição do trocador Na^+/H^+ pelo amiloride, poderia alterar o pH intracelular e inibir a Na^+/K^+ ATPase, como visto aqui. Esta inibição pode estar associada com o efeito do H^+ sobre a estrutura terciária da proteína, levando a uma redução da afinidade ao substrato, como observado para outras proteínas (STRYER, 1988). Já foi observado que uma acidificação intracelular pode levar a uma inibição da Na^+/K^+ ATPase nas brânquias de *C. granulatus* e causar uma alteração nos balanços iônicos e osmóticos, principalmente em meio diluído (CASTILHO *et al.*, 2001) e, conseqüentemente, alterar a taxa de transporte de Ca^{2+} , uma vez que de acordo com os resultados obtidos aqui, o gradiente de Na^+ é necessário e influencia na absorção do Ca^{2+} . Hipótese que também poderia ser estendida às demais espécies de caranguejos utilizadas neste estudo.

7.2 – Transporte de Ca^{2+} em hepatopâncreas

Em hepatopâncreas de *S. rectum* e *C. granulatus*, as concentrações de Ca^{2+} utilizadas (0 – 20 mM) foram suficientes para a saturação dos transportadores de Ca^{2+} que apresentaram uma cinética característica de Michaelis-Menten, no entanto, em *G. cruentata* foi necessário a

utilização de uma concentração de Ca^{2+} maior (0 – 40 mM) para que os transportadores fossem saturados, sendo que foi observado a ocorrência de uma curva de cinética sigmoideal de Hill com 3 parâmetros. O fato de a espécie *G. cruentata* apresentar hábitos alimentares oportunistas, sendo consideravelmente mais ativa no ambiente terrestre que *S. rectum* e *C. granulatus*, *a priori*, indica uma maior demanda do íon Ca^{2+} (para contração muscular, por exemplo) e conseqüente maior necessidade de absorção deste íon do meio-ambiente, o que justificaria a ocorrência de uma cinética cooperativa de Hill (que permite uma melhor regulação da resposta dos transportadores/enzimas às variações de concentração do substrato).

Em *S. rectum* e *C. granulatus* em fase de intermuda, a redução observada nos valores de V_{\max} com a utilização dos inibidores amiloride, verapamil e amiloride + verapamil conjugados está de acordo com o observado na literatura. Esse efeito do inibidor amiloride também foi observado por BENOS (1982), LAZDUNSKI e colaboradores (1985), GALIZZI e colaboradores (1986) e KLEYMAN e KRAGOE (1988), onde o amiloride, conhecido por inibir principalmente o trocador Na/Ca^{2+} (sendo os canais de Ca^{2+} , geralmente inibidos por verapamil, responsáveis pela difusão deste pela membrana plasmática da célula). WHEATLY e colaboradores (2001) observaram que a comparação entre a cinética da absorção de Ca^{2+} dependente de Na^+ (trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) e dependente de ATP (Ca^{2+} ATPase) em lagostim revela que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ tem uma taxa de absorção muitas vezes maior que a bomba de Ca^{2+} , mas que, no entanto, a bomba de Ca^{2+} apresenta uma maior afinidade pelo Ca^{2+} . Já ZHUANG e AHEARN (1998) observaram em hepatopâncreas de lagostas, a capacidade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ foi de aproximadamente a metade da observada para a bomba de Ca^{2+} .

O aumento no transporte de Ca^{2+} promovido pela ouabaína, sugere que a inibição da Na^+/K^+ ATPase favorece o aporte de íons Ca^{2+} pela região apical da célula por meio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (eletrogênico) a partir de um aumento intracelular do íon Na^+ . Por outro lado, a ouabaína prejudica o transporte de Ca^{2+} pela região basolateral da célula (para a hemolinfa), pois o aumento intracelular da concentração de Na^+ desfavorece a atividade dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, sendo que este efeito também foi observado por MOONGA e colaboradores (2001), indicando que a ocorrência de uma variação no efeito causado pelo inibidor dependeria do lado da membrana no qual este se ligaria. Deve, também, ser considerado que a concentração de ouabaína utilizada é muito menor que a reportada em experimentos com células de vertebrados e pode haver um efeito dose-dependente relacionado à inibição/estimulação do trocador (AHEARN & FRANCO, 1990).

Já em relação aos resultados obtidos em fase de pós-muda, apesar de não ter ocorrido alterações estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros de cinética enzimática com os tratamentos utilizando inibidores, foi observada uma tendência ao aumento nos valores obtidos em relação ao controle. Deve ser levado em conta, também, que a ação (no caso estimulatória) do amiloride já foi observada por DE LA PENA e REEVS (1987), que ocorre dependendo do lado da membrana que o inibidor se liga. WHEATLY e colaboradores (2001) sugere que a importância relativa do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da bomba Ca^{2+} ATPase pode variar entre os epitélios em dadas espécies, sugerindo expressão /ou regulação diferencial; e cita ainda que a afinidade pelo Ca^{2+} em espécies aquáticas foi tipicamente uma ordem de magnitude maior para a bomba de Ca^{2+} que para o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Quando comparados os estágios de muda (controle) em *S. rectum* e *C. granulatus* em relação ao componente de difusão, o aumento observado na pós-muda se deve possivelmente ao fato de o Ca^{2+} armazenado no hepatopâncreas poder ser mobilizado rapidamente pelo canal de Ca^{2+} (também facilitado pelo aumento observado no parâmetro V_{max} em *S. rectum*), uma vez que caranguejos terrestres costumam armazenar Ca^{2+} no hepatopâncreas entre mudas. Segundo AHEARN e colaboradores (2004), as células epiteliais do hepatopâncreas de lagostas apresentam grande significância no balanço de cálcio do animal durante o ciclo de muda. Para que a lagosta e outros crustáceos possam crescer, o antigo exoesqueleto deve ser substituído por um exoesqueleto novo e maior para acomodar o “aumento de massa” do animal. Durante a muda, grande parte do cálcio contido no antigo exoesqueleto é solubilizado, transferido para a hemolinfa, armazenado em concreções com SO_4 e PO_4 nas células epiteliais do hepatopâncreas, ou transferido através dessas células para o lúmen do estômago, onde são armazenadas como material sólido na forma de gastrólitos. Seguindo-se a muda, o novo exoesqueleto é frágil e precisa ser rapidamente calcificado para proteção do animal. Neste período o processo de armazenamento é revertido, e o cálcio liberado dos gastrólitos e concreções hepatopancreáticas é “descarregado” na hemolinfa, para se juntar ao cálcio absorvido do meio externo, onde são eventualmente incorporados ao novo exoesqueleto, endurecendo-o. As células epiteliais hepatopancreáticas devem ser adaptadas ao transporte e acúmulo de quantidades consideráveis deste cátion durante estes períodos cíclicos de transporte de grandes quantidades de cálcio.

Os processos de transporte de Ca^{2+} pela região apical têm sido caracterizados em

hepatopâncreas de lagostas (AHEARN & ZHUANG, 1996; ZHUANG & AHEARN, 1996) e glândula antenal através do isolamento de vesículas de membranas (AHEARN & FRANCO, 1990). AHEARN e FRANCO (1990) observaram que o Ca^{2+} compete com o Na^+ pelos sítios de ligação do trocador eletrogênico $2\text{Na}^+/1\text{H}^+$ (ou 1Ca^{2+}) sensível ao amiloride. Já o transporte de Ca^{2+} através da membrana basolateral se dá contra um gradiente eletroquímico (de aproximadamente $1\mu\text{M}$ no citosol para aproximadamente 10mM na hemolinfa) e requer um arranjo de processos dependentes de energia que envolvem a hidrólise de ATP diretamente (Ca^{2+} -ATPases) ou indiretamente (através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o qual utiliza o gradiente gerado pela bomba de Na^+). O aumento no transporte de Ca^{2+} promovido pela ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ ATPase) sugere, de maneira semelhante ao ocorrido em brânquias, uma dependência de um gradiente de íons Na^+ para a absorção de íons Ca^{2+} pela região apical da célula por meio do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Por outro lado, o aumento no gradiente de Na^+ prejudica o transporte de Ca^{2+} pela região basolateral da célula (para a hemolinfa), desfavorecendo a atividade dos trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Provavelmente, o aumento ou redução da concentração intracelular de Ca^{2+} depende da proporção de trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ entre a região apical e a região basolateral nas células.

Em comparação ao transporte de Ca^{2+} nas espécies estudadas em fase de pós-muda, *G. cruentata* apresentou os maiores valores de V_{max} seguido de *S. rectum*, e *C. granulatus* apresentou os menores valores e, em relação ao K_m , *C. granulatus* apresentou valores aproximadamente 4 vezes menores que os observados em *S. rectum*. Já que *C. granulatus* apresenta menor nível de terrestrialidade, essa maior afinidade e menor capacidade do trocador em relação ao observado em *S. rectum*, o qual vive em um ambiente com menor disponibilidade de íons (no caso Ca^{2+}), condiz com o esperado, uma vez que não há a necessidade de uma capacidade de transporte tão grande quanto em *S. rectum*. Já *G. cruentata*, por apresentar uma cinética de transporte de Ca^{2+} do tipo cooperativa de Hill necessitou de maiores concentrações de Ca^{2+} em relação às outras espécies estudadas para que os transportadores fossem saturados, onde o coeficiente de Hill, que segundo TIPTON (1992) e EISENTHAL e DANSON (1992) pode ser definido como a medida de cooperatividade entre os sítios ativos de uma enzima, dificulta a comparação deste parâmetro em relação às outras espécies estudadas. A ocorrência deste tipo de cinética em *G. cruentata* pode ser referente á uma adaptação ao ambiente terrestre, onde apesar de apresentar o mesmo nível de terrestrialidade que *S. rectum*, deve ser lembrado que é difícil definir os limites de transição entre cada nível de terrestrialidade.

CHAVEZ-CROOKER e colaboradores (2001) em seus experimentos observaram o efeito do estágio de muda em células E e R de hepatopâncreas em *Homarus americanus*, onde foi observado um aumento de aproximadamente 2 vezes no conteúdo de cálcio nessas células no estágio de pós-muda, quando comparados com o estágio de intermuda. Já WHEATLY e colaboradores (2002) em seu experimentos, observaram que em relação à cinética de absorção de Ca^{2+} em hepatopâncreas de lagostim, o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ apresentou valores de V_{\max} 70 vezes maiores do que o observado na bomba de Ca^{2+} (no entanto a bomba de Ca^{2+} apresenta uma maior afinidade pelo Ca^{2+}), sendo que resultados semelhantes foram observados em eritrócitos de tilápias marinhas e dulcícolas (SCHOENMAKERS et al, 1993). Estes estudos podem confirmar a hipótese de que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ afeta diretamente o efluxo basolateral de Ca^{2+} associado ao influxo via hepatopâncreas enquanto a bomba de Ca^{2+} é responsável pela manutenção dos baixos níveis intracelulares de Ca^{2+} . Em hepatopâncreas de lagostas, a capacidade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ foi aproximadamente a metade daquela reportada para a bomba de Ca^{2+} (ZHUANG & AHEARN, 1998). Experimentos em duodenos de ratos demonstraram a ocorrência de bombas de Ca^{2+} com maior capacidade que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; no entanto, os mecanismos de absorção foram aproximadamente equivalentes nas regiões do jejuno e íleo (GHIJSEN et al., 1983).

Segundo WHEATLY e colaboradores (2002) a importância relativa do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da bomba de Ca^{2+} pode variar entre os epitélios em certas espécies, sugerindo uma expressão e/ou regulação diferencial. e a taxa de absorção máxima de Ca^{2+} através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ observada em lagostins foi da mesma ordem de magnitude quando comparada com o observado em epitélios digestórios de outras espécies aquáticas; no entanto, foi um décimo do valor observado em hepatopâncreas de lagostas (ZHUANG & AHEARN, 1998). Estudos em tilápias mostraram valores de V_{\max} menores em animais aclimatados à água do mar e o oposto ocorreu em animais aclimatados em água doce (SCHOENMAKERS et al. 1993). AHEARN e colaboradores (1990) concluíram que os níveis de íons do ambiente (tanto o fluido extracelular quanto a concentração da água do ambiente) podem influenciar a cinética dos transportadores de íons, conclusão essa baseada nos valores de V_{\max} observados em vesículas de hepatopâncreas de uma grande variedade de crustáceos. Uma explicação alternativa para a diferença nos valores de V_{\max} observada entre lagostins e lagostas seria o fato de expressarem diferentes isoformas do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ predominante em membranas basolaterais de hepatopâncreas de lagostas é eletrogênico (ZHUANG & AHEARN, 1998), já WHEATLY e colaboradores (2002) observaram a ocorrência do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ eletroneuro.

As diferenças nas cinéticas podem também refletir diferentes modos para a absorção do Ca^{2+} . Em lagostas, o Ca^{2+} é armazenado em organelas intracelulares das células hepatopancreáticas, durante a pós-muda elas são liberadas, aumentando a concentração intracelular de Ca^{2+} e explicando a necessidade de trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de menor afinidade em lagostas, quando comparados com lagostins (WHEATLY *et al.*, 2002)

A ocorrência do canal de Ca^{2+} inibido por verapamil tem sido descritas em membranas apicais de células B hepatopancreáticas em *Penaeus* e *Homarus* (ZILLI *et al.*, 2001). ZANOTTO e WHEATLY (2003), em seus estudos observaram que a Ca^{2+} ATPase trabalha com metade de sua capacidade total no período de intermuda e que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ é estruturado para suportar aumentos na sua capacidade de transporte - esta capacidade possivelmente é necessária no período de pós-muda, quando o fluxo unidirecional de Ca^{2+} aumenta. Também observaram que o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pode afetar o fluxo basolateral sem proliferação ou ativação de proteínas adicionais, enquanto que a Ca^{2+} ATPase pode necessitar de regulação durante o período de pós-muda.

7.3 – Transporte de Ca^{2+} em glândula antenal

A glândula antenal têm emergido como epitélio de transporte chave para os processos de manutenção dos fluidos extracelulares em concentrações acima daquela observada na água doce (WHEATLY *et al.*, 2004). Em glândula antenal de *S. rectum*, *C. granulatus* e *G. cruentata*, as concentrações de Ca^{2+} utilizadas (0 – 2,5 mM) foram suficientes para a saturação dos transportadores de Ca^{2+} .

Em glândula antenal, a cinética do transporte de Ca^{2+} ocorreu obedecendo a cinética de Michaelis-Menten, de maneira semelhante ao ocorrido em hepatopâncreas, (Tabelas 7 e 8), sendo a principal diferença o valor do K_m do controle (bem mais baixo) demonstrando uma maior afinidade dos transportadores ao Ca^{2+} , e utilizando-se de concentrações de Ca^{2+} menores (0-2,5 mM). WHEATLY (2001) em seu trabalho, observa que a taxa máxima de absorção do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de glândula antenal (quando comparado com outros epitélios) foi bem maior que o observado em estudos em mamíferos. Por outro lado, JAYAKUMAR e colaboradores (1984) obtiveram valores de K_m uma ordem de magnitude maior. As concentrações de Ca^{2+} utilizadas (0 – 2,5 mM) foram suficientes para a saturação dos transportadores de Ca^{2+} nas

espécies estudadas aqui.

Em fase de intermuda, possivelmente as concentrações utilizadas dos inibidores não foram suficientes para promover alterações estatisticamente significativas. Já em fase de pós-muda, em relação ao K_m , houve uma discreta alteração dos valores obtidos com a utilização dos inibidores amiloride e amiloride + verapamil conjugados em relação ao controle. No entanto, estudos efetuados por JAYAKUMAR e colaboradores (1984) em ratos e SCOBLE e colaboradores (1985) em cães, obtiveram valores de K_m uma ordem de magnitude maior do que o observado nos resultados apresentados aqui. O inibidor amiloride e amiloride + verapamil conjugados promoveram um aumento nos valores da constante de Michaelis-Menten em *C. granulatus* e em *G. cruentata*. Já em *S. rectum* o efeito dos inibidores conjugados foi inverso, reduzindo os valores da constante. A afinidade em glândula antenal de lagostim foi comparável a um estudo em vesículas de membrana basolateral de córtex de rim de rato (VAN HEESWIJK, *et al.*, 1984). Segundo WHEATLY e colaboradores (2001), as regras relativas ao trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a Ca^{2+} ATPase em glândula antenal são similares às determinadas para hepatopâncreas. O trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ apresenta 40 vezes a capacidade da bomba de Ca^{2+} e, ainda assim, o K_m é menor para o trocador. Isto é exatamente o oposto observado para o epitélio renal de tilápia e em alguns mamíferos, onde se acredita que a bomba de Ca^{2+} tem papel predominante na transferência de Ca^{2+} . Comparado com os dados de outros epitélios, a taxa máxima de absorção observada com o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ em glândula antenal de lagostim foi maior que o observado em estudos em mamíferos ($K_M = 0.59 \mu\text{M}\cdot\text{Ca}^{2+}$, $V_{\text{max}} = 22.03 \text{ nmol Ca}^{2+} / \text{min}$ e $K_M = 0.20 \mu\text{M}\cdot\text{Ca}^{2+}$, $V_{\text{max}} = 6.40 \text{ nmol Ca}^{2+} / \text{min}$, respectivamente); isto pode refletir uma necessidade de aumento da reabsorção de Ca^{2+} em espécies que vivem em água doce (WHEATLY *et al.*, 2001). Também sugere que a importância relativa do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da bomba Ca^{2+} ATPase pode variar entre os epitélios em dadas espécies, sugerindo expressão/ou regulação diferencial; e cita ainda que a afinidade pelo Ca^{2+} em espécies aquáticas foi tipicamente uma ordem de magnitude maior para a bomba de Ca^{2+} que para o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Em fase de intermuda, apesar de ainda ser necessário a calibração dos valores obtidos, as espécies estudadas apresentaram uma taxa de transporte (relativa à variação de fluorescência arbitrária) de Ca^{2+} de aproximadamente 18 a 82 vezes maiores em intermuda [*S. rectum* ($K_M = 0.14$, $V_{\text{max}} = 1825,94 \Delta\text{fluorescência} \cdot \text{mg proteína } 180\text{s}^{-1}$); *C. granulatus* ($K_M = 0.03$, $V_{\text{max}} = 118,02 \Delta\text{fluorescência} \cdot \text{mg proteína } 180\text{s}^{-1}$); *G. cruentata* ($K_M = 0.03$, $V_{\text{max}} = 485,71 \Delta\text{fluorescência} \cdot \text{mg proteína } 180\text{s}^{-1}$)] e de 19 a 52 vezes maiores em pós-muda [*S. rectum* ($K_M = 0.07$, $V_{\text{max}} = 1151,35 \Delta\text{fluorescência} \cdot \text{mg proteína } 180\text{s}^{-1}$); *C. granulatus* ($K_M = 0.03$, $V_{\text{max}} =$

122,52 Δ fluorescência \cdot mg proteína $180s^{-1}$); *G. cruentata* ($K_M = 0.04$, $V_{max} = 554,75$ Δ fluorescência \cdot mg proteína $180s^{-1}$)], quando comparados à literatura (WHEATLY *et al.*, 2001).

WHEATLY (2001) comenta que uma grande variedade de compostos farmacêuticos têm sido utilizados como inibidores do trocador Na^+/Ca^{2+} . O amiloride, conhecido por competir com o Na^+ em canais de Na^+ e em trocadores Na^+/H^+ , bloqueia ambos os mecanismos quando utilizado em concentrações de 10^{-4} mol \cdot L $^{-1}$. DE LA PENA e REEVS (1987) comentam que um efeito estimulatório no transporte de cálcio também pode ser observado com a utilização do amiloride e seus derivados, sendo que este depende do lado da membrana a que o inibidor se liga.

As variações nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} dependem, provavelmente, da proporção de trocadores Na^+/Ca^{2+} entre a região apical e a região basolateral nas células, e o resultado final observado em pós-muda foi uma tendência à redução no transporte total de cálcio, enquanto que em intermuda o efeito observado foi o oposto. Mas não houve efeito nos parâmetros de V_{max} e K_m na pós-muda em relação ao controle da intermuda.

Em comparação com o transporte em hepatopâncreas e com excessão de *S. rectum*, *C. granulatus* e *G. cruentata* apresentaram menores valores de V_{max} , e menores valores de K_m , o oposto do ocorrido em brânquias e, considerando a diferença no nível de terrestrialidade entre *S. rectum*, *C. granulatus* e *G. cruentata* (ver MELO, 1996), indicando que apesar de as brânquias permanecerem como o principal sítio de trocas iônicas (com alta capacidade de transporte), ocorre uma relação entre o nível de terrestrialidade e a importância do hepatopâncreas (com maior afinidade ao Ca^{2+}) na absorção/transporte de Ca^{2+} .

AHEARN e ZHUANG (1996), ZHUANG e AHEARN (1996) têm caracterizado os processos de transporte de Ca^{2+} pela região apical em hepatopâncreas de lagostas e AHEARN e FRANCO (1990) fizeram o mesmo em glândula antenal, através do isolamento de vesículas de membranas, onde observaram que o Ca^{2+} compete com o Na^+ pelos sítios de ligação do trocador eletrogênico $2Na^+/1H^+$ (ou $1Ca^{2+}$) sensível ao amiloride. O transporte de Ca^{2+} através da membrana basolateral se dá contra um gradiente eletroquímico (de aproximadamente $1\mu M$ no citosol para aproximadamente $10mM$ na hemolinfa), requerindo um arranjo de processos diretamente dependentes da hidrólise de ATP (Ca^{2+} -ATPases) ou indiretamente dependentes, através do trocador Na^+/Ca^{2+} o qual utiliza o gradiente gerado pela bomba de Na^+ . A

comparação entre a cinética da absorção de Ca^{2+} dependente de Na^+ (trocaador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) e dependente de ATP (Ca^{2+} ATPase) em lagostim observadas por WHEATLY e colaboradores (2001), revelam que o trocaador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ apresenta uma taxa de absorção muitas vezes maior que a bomba de Ca^{2+} , mas que, no entanto, a bomba de Ca^{2+} apresenta uma maior afinidade pelo Ca^{2+} . O aumento no transporte de Ca^{2+} promovido pela ouabaína (inibidor da Na^+/K^+ ATPase) sugere, de maneira semelhante ao ocorrido em brânquias, uma dependência de um gradiente de íons Na^+ para a absorção de íons Ca^{2+} pela região apical da célula por meio do trocaador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. E, da mesma maneira, o aumento no gradiente de Na^+ prejudica o transporte de Ca^{2+} pela região basolateral da célula (para a hemolinfa), o que desfavorece a atividade dos trocaadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. É provável que o aumento ou redução da concentração/fluxo intracelular de Ca^{2+} dependa da proporção de trocaadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ entre a região apical e a região basolateral nas células.

Segundo WHEATLY e colaboradores (2004), nas células epiteliais de glândula antenal de lagostim de água doce, durante o período de intermuda normalmente 92% do Ca^{2+} presente no filtrado urinário é reabsorvido (GREENAWAY, 1972, 1974; WHEATLY & TOOP, 1989) e o influxo unidirecional de Ca^{2+} nas glândulas antenais ($\sim 40 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{h}^{-1}$) ultrapassam os observados em brânquias ou epitélio digestivo. O efluxo basolateral ativo de Ca^{2+} envolve a Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (PMCA), a qual tem sido caracterizada pelo uso de técnicas com vesículas de membranas (WHEATLY *et al.*, 1999). WHEATLY e colaboradores (2004) observaram que a capacidade de absorção do Ca^{2+} *in vitro* foi particamente idêntica à observada *in vivo* em fase de intermuda, no entanto, durante a pós-muda, para corrigir a hemodiluição causada pela absorção de água doce durante a ecdise, a reabsorção renal de Ca^{2+} deve aumentar aproximadamente 40%, o que deve ocorrer pela proliferação das Ca^{2+} ATPases da membrana plasmática (WHEATLY *et al.*, 2004). Técnicas de hibridização *in vitro* e imunolocalização revelaram que a isoforma 3 da Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática (PMCA3) se expressou em todas as regiões da glândula antenal, sendo mais abundante nas regiões do labirinto e canal nefridial (sendo que foi menos abundante no sáculo e na bexiga). A análise quantitativa da hibridização indicou que a expressão da PMCA3 aumentou significativamente no período de pré-muda, quando comparado com a intermuda, sendo que o aumento foi ainda maior no estágio de pós-muda (WHEATLY *et al.*, 2004). Confirmando a importância da glândula antenal para a absorção de íons, a atividade específica de enzimas-chave observadas para o movimento de íons (bombas de Na^+ e Ca^{2+}) foi maior para glândula antenal do que para brânquias em lagostim (WHEATLY *et al.*, 2004). Uma miríade de canais de

Ca^{2+} , bombas e trocadores estão envolvidos no transporte de Ca^{2+} epitelial e o modelo emergente para o fluxo transcelular de Ca^{2+} é complexo e a Ca^{2+} ATPase da membrana plasmática, que é um mecanismo dependente de ATP localizado na membrana plasmática e que, acredita-se, junto com o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ regulem o fluxo renal de Ca^{2+} (presume-se que a absorção basolateral de Ca^{2+} ocorra contra um gradiente de concentração do citoplasma para a hemolinfa) (WHEATLY *et al.*, 2004).

7.4 – Outros fatores que podem influenciar o transporte de Ca^{2+}

O hábito alimentar dos caranguejos, segundo ZANOTTO e WHEATLY (2003), também é um fator a ser considerado em relação à evolução dos mecanismos de transporte de Ca^{2+} , uma vez que espécies carnívoras obtêm grandes quantidades de Ca^{2+} disponíveis nos fluídos dos animais, enquanto que caranguejos herbívoros obtêm pequenas quantidades de Ca^{2+} de folhas, em especial folhas verdes (GREENAWAY & RAGHAVEN, 1998). No entanto, os caranguejos terrestres se apresentam bastante ativos na procura de alimento e sua dieta é bastante diversificada, de modo a suprir qualquer deficiência mineral que possa ocorrer em seu ambiente (HERREID & FULL, 1988), justificando as diferenças nas taxas de transporte de Ca^{2+} entre as espécies estudadas.

Um outro fator que pode possivelmente ter influenciado os resultados obtidos, se relaciona à técnica utilizada, que por utilizar uma dispersão de células dos tecidos estudados, ao invés de utilizar técnicas com vesículas de membranas celulares, promove a perda de polarização das células e permite a observação/ avaliação do fluxo total de Ca^{2+} nas células (Influxo versus efluxo de Ca^{2+}). A não utilização de técnicas com vesículas de membranas permite uma avaliação mais “holística” das células, pois todos os mecanismos de transporte e responsáveis pela homeostase do Ca^{2+} continuam funcionando e interagindo entre si durante a aquisição dos dados.

A técnica utilizada neste estudo faz uso do indicador fluorescente para Ca^{2+} Fluo-3, que utiliza um único comprimento de onda, onde há modulação da intensidade da fluorescência. O Fluo-3 incorpora cromóforas de fluorescina e são excitados em comprimentos de onda típicos para fluorescina. O Fluo-3 exibe a maior mudança de intensidade da fluorescência na transição da forma não-ligada ao Ca^{2+} para a forma ligada ao Ca^{2+} , de 40 a 100 vezes. (MINTA *et al.*,

1989 e HAUGLAND, 1992), o que o torna suficientemente sensível para detectar mínimas mudanças na concentração intracelular de Ca^{2+} , neste caso, influxo de Ca^{2+} . As mudanças na concentração de Ca^{2+} intracelular geram mudanças na intensidade de fluorescência de excitação e no espectro de emissão, onde o espectro de emissão se mantém essencialmente inalterado.

Os indicadores fluorescentes para Ca^{2+} são ânions policarboxilados que não podem atravessar a bicamada lipídica da membrana e, portanto, não são permeáveis à célula. Na forma negativamente carregada, os indicadores podem ser introduzidos nas células somente por microinjeção ou por permeabilização, procedimentos que requerem equipamento especial e morte de célula. O melhor meio de fazer com que o indicador de fluorescência entre na célula é incubar as células em uma solução diluída ou dispersão de formas AM éster do indicador. O grupo AM éster é usado para mascarar as cargas negativas dos grupos carboxila presentes na molécula do indicador. A forma éster do indicador não apresenta carga elétrica e é hidrofóbica. Conseqüentemente, esta forma atravessa as membranas lipídicas e alcança o interior das células. Os grupos carboxila do indicador, no entanto, são essenciais para a habilidade do indicador em detectar Ca^{2+} ; em vista disso, os grupos AM éster devem ser removidos uma vez que o indicador entrou nas células. Devido ao fato de o grupo AM éster ser sensível à hidrólise enzimática por esterases presentes na célula, os grupos AM éster do indicador são processados intracelularmente para liberar a forma policarboxilada sensível ao Ca^{2+} , sendo eletricamente carregada que fica aprisionada dentro da célula. O processo enzimático para gerar um indicador sensível a Ca^{2+} a partir de um indicador na forma AM éster consiste basicamente na hidrólise seqüencial de 4 (até 8) grupos AM éster, dependendo do indicador escolhido. Somente quando todos os grupos AM éster forem hidrolizados, a molécula (indicador) se torna sensível ao Ca^{2+} .

Uma vez que o indicador entrou nas células, um fator que também pode influenciar sobre os resultados obtidos é a taxa de fuga ou extrusão do marcador pelas células, onde o marcador sai da célula em uma taxa que é dependente de temperatura e pode diminuir a sensibilidade da técnica. Os experimentos efetuados no presente trabalho foram efetuados a 25°C . Para células de mamíferos, a taxa de saída do indicador é máxima a 37°C e cai tão logo a temperatura é reduzida, no entanto, não foram encontrados dados referentes a taxa de extrusão do indicador em células de crustáceos. A saída do indicador aparentemente ocorre por mecanismos de extrusão para ânions orgânicos (DI VIRGILIO *et al.*, 1988) e pode ser

efetivamente bloqueado por inibidores do transporte do ácido úrico como o probenescide e sulfipirazona (DI VIRGILIO *et al.*, 1988, 1990), utilizados aqui.

Devido ao fato de o transporte de Ca^{2+} ser medido através de uma dispersão de células dos tecidos, alguns elementos como impurezas e “artefatos” possivelmente afetaram a sensibilidade da técnica utilizada e impossibilitaram a calibração dos valores/ quantidades de Ca^{2+} transportado. Pelo mesmo motivo, os cálculos das constantes de inibição (obtidos a partir da equação de Lineweaver-Burk) também não foram efetuados (SEGEL, 1976).

A calibração é um processo de grande importância, pois permite estimar quantitativamente a concentração de Ca^{2+} intracelular a partir da variação dos sinais de fluorescência e, a partir desses dados determinar de maneira precisa as taxas de transporte desde íon em determinadas condições (KAO, 1994).

Processos de transporte paracelular de Ca^{2+} também podem ter influenciado os resultados obtidos, uma vez que o movimento paracelular de Ca^{2+} envolve o movimento passivo de Ca^{2+} através de junções celulares a partir de um gradiente eletroquímico (WHEATLY, 1999) que poderia permitir a entrada/saída do Ca^{2+} em algumas células (o processo de dispersão das células utilizado no presente projeto permite a ocorrência de grumos de células). O transporte paracelular de Ca^{2+} é o modelo proposto para o armazenamento de Ca^{2+} pré-exuvial nos cecos posteriores do intestino do anfípode *Orchestia* (MEYRAN *et al.*, 1984; MEYRAN & GRAF, 1986). A absorção passiva de Ca^{2+} ocorre através da membrana apical para o citoplasma a favor de um gradiente eletroquímico e é transferido para a hemolinfa contra um gradiente eletroquímico através da membrana basolateral.

8 – Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, observou-se que em crustáceos semi-terrestres a glândula antenal não parece exercer papel relevante na homeostase do Ca^{2+} . Os resultados obtidos em hepatopâncreas, no entanto, sugerem uma tendência em crustáceos com maior nível de terrestrialidade em armazenar o Ca^{2+} em órgãos gastrointestinais como o hepatopâncreas.

Com relação aos inibidores, o inibidor da Na^+/K^+ ATPase (ouabaína) não apresentou resultados esperados, provavelmente devido à alteração no gradiente eletroquímico entre o meio intracelular e o extracelular em relação ao íon Na^+ , onde o aumento do número de cargas positivas no meio intracelular parece dificultar a entrada do íon Ca^{2+} . Há ainda a possibilidade que a perda da polarização da região apical/região basolateral das células quando em dispersão possa influenciar a cinética de transporte do Ca^{2+} , pois há uma diferença entre a quantidade e os tipos de trocadores entre essas regiões da célula, os quais podem, eventualmente, influenciar os resultados obtidos. Vale considerar, ainda, as características fisiológicas particulares dos tecidos estudados nas diferentes espécies de caranguejos, os quais vivem em nichos diferentes, o que poderia justificar essas diferenças nos resultados obtidos. No entanto, verificou-se a importância do gradiente de Na^+ para o transporte secundário de Ca^{2+} nos diferentes tecidos estudados aqui.

9 – Referências bibliográficas

- AHEARN, G. A., MANDAL, P. K., MANDAL, A. Calcium regulation in crustaceans during the molt cycle: a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.137, n.A, p.247-257. 2004.
- AHEARN, G. A., DUERR, J. M., ZHUANG, Z., BROWN, R. J., KILLEBREW, D. A. Ion Transport Processes of Crustacean Epithelial Cells. **Physiological and Biochem. Zool.**, v.72, n.1, p.1-18. 1999.
- AHEARN, G. A. & FRANCO, P. Na and Ca share the electrogenic 2Na/1H antiporter in crustacean antennal glands. **Am J. Physiol.**, v.259, p.F758-F767. 1990.
- AHEARN, G. A. & P. FRANCO. Ca transport pathways in brush border membrane vesicles of crustacean antennal glands. **Am. J. Physiol.** **264**(2): R1206-1213. 1993.
- AHEARN, G. A., MAGINNISS, L. A., SONG, Y. K., TORNQUIST, A. Intestinal water and ion transport in freshwater malacostracan prawns (Crustacea). In: JUNGREN'S, A., T. HODGES, KLEIHZELLER, A., SCHULTZ, S. (Ed.). **Membrane Transport in Plants and Animals**. New York: Academic Press, 1977. p.129-142.
- AHEARN, G. A. & ZHUANG, Z. Cellular mechanisms of calcium transport in crustaceans. **Physiol. Zool.** **69**(1): 383-402. 1996.
- BARNES, R. D. **Invertebrate Zoology**. New York, CBS College Publishing. 1986
- BARNES, D. B. **Zoologia dos Invertebrados**: Editora Roca. 1990. 1177 p.
- BENOS, D. J. 1982. Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. Am. J. Physiol. **242**: c131-c145. 1977.
- BIANCHINI, A. & CASTILHO, C. Effects of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na⁺, K⁺-ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, grapsidae). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.61, n.1, p.63-69. 1999.
- BLISS, D. E. Transition from water to land in decapod crustaceans. **Am. Zool.**, v.8, 355-392. 1986.
- BOSCHI, E. E. Los crustáceos decapoda brachiura del litoral bonaerense. **Bol. Inst. Biol. Mar del Plata**, v.6, p.1-76. 1964.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Bioch.** **72**: 248-254. 1976.
- BRYAN, G. W. Sodium regulation in the crayfish *Astacus fluviatilis*. II. Experiments with sodium depleted animals. **J. Exp. Biol.**, v.37, p.83-89. 1960a.
- BRYAN, G. W. Sodium regulation in the crayfish *Astacus fluviatilis*. III. Experiments with Na-Cl-loaded animals. **J. Exp. Biol.**, v.37, p.113-128. 1960b.

- BURGGREN, W. W. & MCMAHON, B. R. **Biology of the Land Crabs**. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 1988
- CAMERON, J. N. Post-moult calcification in the blue crab *Callinectes sapidus*: timing and mechanisms. **J. Exp. Biol.**, v.143, p.285-304. 1989.
- CAPITOLI, R. R., BEMVENUTI, C. E., GIANUCA, N. M. **Estudos de ecologia bentônica na região estuarial da Lagoa dos Patos. I - As comunidades bentônicas**. Rio Grande: Atlântica, v.3. 1978. 5-22 p.
- CASTILHO, C. P., MARTINS, I. A., BIANCHINI, A. Gill Na^+ , K^+ -ATPase and osmorregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.256, p.215-227. 2001.
- CASTILHO, P. C. **(Na^+ , K^+)ATPase branquial de *Chasmagnathus granulata* DANA, 1851 (DECAPODA-GRAPSIDAE): Propriedades cinéticas e efeito do zinco**. (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996. 78 p.
- CHAVEZ-CROOKER, P., GARRIDO, N., AHEARN, G. A. Copper transport by lobster hepatopancreatic epithelial cells separated by centrifugal elutriation: measurements with the fluorescent dye phen green. **J. Exp. Biol.** **204**: 1433-1444. 2001.
- COPELAND, D. E. & FITZJARREL, A. T. The salt absorbing cells in the gills of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. **Z. Zellforsch.**, v.92, p.1-22. 1968.
- COROTTO, F. S. & HOLLYDAY, C. W. Branchial Na/K-ATPase and osmorregulation in the purple shore crab (*Callinectes sapidus* Rathbun) with notes on modified mitochondria. **Tissue & Cell**, v.21, p.299-318. 1996.
- DE LA PENA, P. & REEVES, J. P. Inhibition and activation of Na^+ - Ca^{2+} exchange activity by quinacrine. **Am. J. Physiol.** **252**: c24-c29. 1987.
- D'INCAO, F., SILVA, K. G., RUFFINO, M. L., BRAGA, A. C. **Hábito alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra de Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae)**. Rio Grande: Atlântica, v.12. 1990. 85-93 p. 1990
- DI VIRGILIO, F., STEINBERG, T. H., SWANSON, J. A., SILVERSTEIN, S. C. Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions **J. Immunol.**, v.140, p.915-920. 1988.
- D'ORAZIO, S. E. & HOLLIDAY, C. W. Gill Na/K-ATPase and osmorregulation in the sand fiddler crab, *Uca pugilator*. **Physiol. Zool.**, v.58, p.364-373. 1985.
- EISENTHAL, R. & DANSON, M. J. **Enzyme Assays: A Practical Approach**. Bath, UK., IRL Press. 1992.
- FLIK, G., VERBOST, P. M., ATSMAN, W., LUCU, C. Calcium transport in gill plasma membrane of the crab *Carcinus maenas*: evidence for carriers driven by ATP and Na^+ gradient. **J. Exp. Biol.** **195**(4): 109-122. 1994.

- GALIZZI, J. P.; BORSOTTO, M.; BARHANIN, J.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. Characterization and phyoaffinity labeling of receptor sites for the Ca^{2+} channel inhibitors D-cis-diltiazem, +/- bepridil, desmethoxyverapamil, and (+)-PN200-110 in skeletal muscle transverse tubule membranes. **J. Biol. Chem.** **261**: 1393-1397. 1986.
- GHIJSEN, W. E. J. M., DE JONG, M. D., VAN OS, C. H. Kinetic properties of Na/Ca₂ exchange in basolateral plasma membranes of rat small intestine. **Biochim. Biophys. Acta** **730**: 85-94. 1983.
- GIBSON, R. B. & BAKER, P. L. The decapod hepatopancreas. **Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.**, v.17, p.285-346. 1979.
- GLYNN, J. P. Studies on the ionic, protein and phosphate changes associated with the moult cycle of *Homarus vulgaris*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.26, p.937-946. 1968.
- GRASZYNSKI, K. & BIGALKI, T. Osmoregulation and ion transport in the extremely euryhaline fiddler crabs *Uca Pugilator* and *Uca tangeri* (Ocypodidae). **Zool. Beitr. N. F.**, v.30, p.339-358. 1986.
- GREENAWAY, P. Calcium regulation in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). I. Calcium balance in the intermoult animal. **J. Exp. Biol.**, v.57, p.471-487. 1972.
- GREENAWAY, P. Calcium balance at the premoult stage of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). **J. Exp. Biol.**, v.61, p.27-34. 1974a.
- GREENAWAY, P. Calcium balance at the postmoult stage of the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). **J. Exp. Biol.**, v.61, p.35-45. 1974b.
- GREENAWAY, P. Freshwater invertebrates. In: G. M. O. Maloy (Ed.). **Comparative physiology of osmoregulation in animals**. London: Academic Press, v.1, p. 117-173. 1979.
- GREENAWAY, P. Calcium balance and moulting in the Crustacea. **Biol. Rev.** **60**: 425-454. 1985.
- GREENAWAY, P. & MORRIS, S. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab, *Birgus latro* L.: Nitrogenous excretion. **J. Exp. Biol.** **143**: 333-346. 1989.
- GREENAWAY, P. & RAGHAVEN, S. Digestive strategies in two species of leaf-eating land crabs (Brachyura: Geocarcinidae) in a rain forest. **Physiol. Zool.**, v.71, p.36-44. 1998.
- GROSS, W. J. & CAPEN, R. L. Some functions of the urinary badder in a crab. **Biol. Bull. (Woods Hole, Mass.)**, v.131, p.272-291. 1966.
- HARRIS, R. R. & BAYLISS, D. Gill ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)-ATPases in decapod crustaceans: distribution and characteristics in relation to Na^+ regulation. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.A 90, p.303-308. 1988.
- HARRIS, R. R. & SANTOS, M. C. F. Sodium uptake and transport ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$ and ATPase changes following Na^+ depletion and low acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.)). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.105A, n.1, p.35-42. 1993.

- HARTNOLL, R. G. Growth. In: L. G. Abelle (Ed.). **The biology of Crustacea**. New York: Academic Press, v.2, 1982. Growth, p.111-196
- HARTNOLL, R. G. Strategies of crustacean growth. **Mem. Austr. Mus.**, v.18, p.121-131. 1983.
- HARVEY, P. H. & PAGEL, M. D. **The Comparative Method in Evolutionary Biology**. Oxford, Oxford University Press. 1991.
- HAUGLAND, R. P. **Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals**. Eugene, Oregon: Molecular Probes. 1992
- HENRY, R. P. & WHEATLY, M. G. Salinity-induced changes in gill Na^+/K^+ ATPase activity in the mud fiddler crab *Uca puginax*. **J. Exp. Zool.**, v.223, p.199-208. 1988.
- HERREID, C. F. & FULL, R. J. Energetics and locomotion In: BURGGREN, W. W. & McMAHON, B. R. (Ed.). **Biology of the Land Crabs**. Cambridge: Cambridge University Press, p.333-377. 1988
- HOLLIDAY, C. W. Salinity-induced changes in gill Na, K-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca puginax*. **J. Exp. Zool.**, v.233, p.199-208. 1985.
- HOLLIDAY, C. W. & MILLER, C. S. PAH transport in rock crab (*Cancer irroratus*) urinary bladder. **Am J. Physiol**, v.238, p.R311-R317. 1980.
- JAYAKUMAR, A.; CHENG, L.; LIANG, C. T.; SACKTOR, B. Sodium gradient-dependent calcium uptake in renal basolateral membrane vesicles. **J. Biol. Chem.** **259**: 10827-10833. 1984.
- JOHNSON, P. T. **Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus***. New York: Praeger Scientific. 1980
- KAO, J. P. Y. Practical Aspects of Measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ with Fluorescent Indicators. In: Nuccitelli, R. (Ed.). **Methods in Cell Biology**. New York: Academic Press, v.40, 1994. Practical Aspects of Measuring $[\text{Ca}^{2+}]$ with Fluorescent Indicators, p.155-181
- KLEYMAN, T. R. & CRAGOE, E. J. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. **J. Membrane Biol** **105**: 1-21. 1988.
- KROGH, A. **Osmotic Regulation in Animals**. Cambridge: Cambridge University Press. 1939
- LAZDUNSKI, M.; FRELIN, C.; VIGNE, P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. **J. Molec. Cell. Cardiol.** **17**: 1029-1042. 1985.
- LEE, C. E. & BELL, M. A. Causes and consequences of recent freshwater invasions by saltwater animals. **Trends in Ecology and Evolution**, v.14, n.7, p.284-288. 1999.
- LOCKWOOD, A. P. M. Transport and osmoregulation in Crustacea. In: B. L. Gupta, J. L. Oschman, *et al* (Ed.). **Transport of Ions and Water in Animals**. London: Academic Press, 1977. p.673-707

- LOIZZI, R. F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. **Z. Zellforsch.**, v.113, p.420-440. 1971.
- LUCU, C. Ionic regulatory mechanisms in crustacean gill epithelia. **Comp. Biochem. Physiol. A**. **97**: 297-306. 1990.
- LUCU, C. Calcium-Transport across Isolated Gill Epithelium of *Carcinus*. **Journal of Experimental Zoology** **268**(5): 339-346. 1994.
- LUCU, C. & DEVESCOVI, M. Osmoregulation and branchial Na⁺, K⁺-ATPase in the lobster *Homarus gammarus* acclimated to diluted seawater. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v.234, p.291-304. 1999.
- LUCU, C., DEVESCOVI, M., SIEBERS, D. Do amiloride and ouabain affect ammonia fluxes in perfused *Carcinus* gill epithelia? **J. Exp. Zool.**, v.249, p.1-5. 1989.
- LUCU, C. & SIEBERS, D. Amiloride-sensitive sodium flux and potentials in perfused *Carcinus* gill preparations. **J. Exp. Biol.** **122**:25-35. 1986.
- LUCU, C. & SIEBERS, D. Linkage of Cl fluxes with ouabain sensitive Na/K exchange through *Carcinus* gill epithelia. **Comp. Biochem. Physiol. A** **87**: 807-811. 1987.
- MANTEL, L. H. & FARMER, L. L. Osmotic and ionic regulation. In: **The Biology of Crustacea, Vol. 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation**. L. L. Mantel. New York, Academic Press: pp471. 1983.
- MELO, G. A. S. **Manual de Identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do Litoral Brasileiro**. São Paulo, Editora Plêiade/FAPESP. 1996.
- MEYRAN, J.-C. & GRAF, F. Ultrahistochemical localization of Na⁺-K⁺ATPase, Ca⁺-ATPase and alkaline phosphatase activity in a calcium transporting epithelium of a crustacean during molting. **Histochemical**, v.85, p.313-320. 1986.
- MEYRAN, J.-C. & GRAF, F., NICAISE, G. Calcium pathway through a mineralizing epithelium in the crustacean *Orchestia* in premoult: ultrastructural cytochemistry and X-ray microanalysis. **Tissue & Cell**, v.16, p.268-286. 1984.
- MINTA, A., J. P. Y. KAO, KAO, J. P. Y., TSIEN, R. Y. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores **J. Biol. Chem.**, v.264, n.8171-8178. 1989.
- MOONGA, B. S., DAVIDSON, R., SUN, L., ADEBANJO, O. A., MOSER, J., ABEDIN, M., ZAIDI, N., HUANG, C. L. -H., ZAIDI, M. Identification and characterization of a sodium/calcium exchanger, NCX-1, in osteoclasts and its role in bone resorption. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.283, p.770-775. 2001.
- MORRIS, S., TAYLOR, H. H., GREENAWAY, P. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab *Birgus latro* VII. The branchial chamber and its role in urine reprocessing. **J. Exp. Biol.** **161**: 315-331. 1991
- NEUFELD, G. J., HOLLIDAY, C. W., PRITCHARD, J. B. Salinity adaptation of gill Na, K ATPase

in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **J. Exp. Biol.**, v.211, p.215-224. 1980.

ONKEN, H. & SIEBERS, D. Voltage-clamp measurements on single split lamellae of posterior gills of the shore crab *Carcinus maenas*. **Mar. Biol.** **114**: 385-390. 1992.

PARRY, G. Excretion. In: T. H. Waterman (Ed.). **Physiology of Crustacea**. New York: Academic Press, v.1, 1960. Excretion, p.341-366

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **J. Crust. Biol.** **15**: 1-60. 1995.

PÉQUEUX, A. & GILLES, R. Osmoregulation of the chinese crab *Eriocheir sinensis*. Ionic transport across isolated perfused gills as related to the saline environment. In: MCLUSKY, D. S. & BERRY, A. J. (Ed.). **Physiology and behaviour of marine organisms**. New York: Pergamon Press, 1978. p.105-111

PÉQUEUX, A., MARCHAL, A., WANSON, S., GILLES, R. Kinetic characteristics and specific activity of gill ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$) ATPase in the euryhaline Chinese crab, *Eriocheir sinensis*, during salinity acclimation. **Mar. Biol. Letters**, v.5, p.35-45. 1984.

PETERSON, R. D. & LOIZZI, R. F. Regional cytology and cytochemistry of the crayfish kidney tubule. **J. Morphol.**, v.141, p.133-146. 1973.

PETERSON, R. D. & LOIZZI, R. F. Ultrastructure of the crayfish kidney - coelomosac, labyrinth, nephridial canal. **Journal of Morphology** **142**: 241-264. 1974.

PROSSER, C. L. **Comparative Animal Physiology**. 3 ed. Philadelphia: Saunders. 1973

RIEGEL, J. **Comparative Physiology of Renal Excretion**. Edinburgh: Oliver and Boyd. 1972

RIEGEL, J. A. & COOK, M. A. Recent studies of excretion in Crustacea. In: A. Wessing (Ed.). **Excretion**. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1975. p.48-75

RIEGEL, J. A., LOCKWOOD, A. P. M., NORFOLK, J. R. W., BULLEID, N. C., TAYLOR, P. S. Urinary bladder volume and the reabsorption of water from the urine of crabs. **J. Exp. Biol.**, v.60, p.167-181. 1974.

RIESTENPATT, S., ONKEN, H., SIEBERS, D. Active absorption of Na and Cl across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage-clamp and ion-flux studies. **J. Exp. Biol.** **199**: 1545-1554. 1996.

ROER, R. D. Mechanisms of resorption and deposition of calcium in carapace of the crab *Carcinus maenas*. **J. Exp. Biol.**, v.88, p.205-218. 1980.

SARVER, R. G., FLYNN, M. A., HOLLIDAY, C. W. Renal Na, K-ATPase and osmoregulation in the crayfish *Procambarus clarkii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.A 107, p.349-356. 1994.

SCHUBART, C. D., NEIGEL, J. E., FELDER, D. L. Use of the mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies of Crustacea. **Crustacean Issues**, in press. 2000.

SCOBLE, J. E.; MILLS, S.; HRUSKA, K. A. (1985). Calcium transport in canine renal basolateral

membrane vesicles. **J. Clin. Invest.** **75**: 1096-1115.

SCHWARZ, H.-J. & GRASZYNSKI, K. Characterization of Na⁺-transport from posterior gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis* using voltage-clamp-technique. **Verh. dt. zool. Ges.**, v.83, p.555-556. 1990.

SEGEL, I. R. **Biochemical Calculations**. New York: John Willey & Sons. 1976. 441 p.

SHAW, J. The absorption of ions by the crayfish. I. The effect of internal and external sodium concentrations. **J. Exp. Biol.**, v.36, p.136-144. 1959a.

SHAW, J. Salt and water balance in the East African freshwater crab *Potamon niloticus* (M. Edw.). **J. Exp. Biol.**, v.36, p.157-176. 1959b.

SHAW, J. The absorption of ions by the crayfish. II. The effect of external anion. **J. Exp. Biol.**, v.37, p.534-547. 1960.

SHAW, J. Studies on ionic regulation in *Carcinus maenas*. **J. Exp. Biol.**, v.38, p.135-152. 1961.

SHETLAR, R. E. & TOWLE, D. W. Eletrogenic sodium-proton exchange in membrane vesicles from crab (*Carcinus maenas*) gill. **Am. J. Physiol.** **257**: R924-931. 1989.

SIEBERS, D., LEWECK, K., MARKUS, H., WINKLER, A. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. **Mar. Biol.**, v.69, p.37-43. 1982.

SCHOENMAKERS, T. J. M., VERBOST, P. M., FLIK, G., WENDELAR BONGA, S. E. Transcellular intestinal calcium transport in freshwater and seawater fish and its dependence on sodium/calcium exchange. **J. Exp. Biol.**, v.176, p.195-206. 1993.

SKOU, J. C. Enzymatic basis for archive transport of Na⁺ and K⁺ across cell membrane. **Physiol. Rev.**, v.45, p.596-617. 1965.

SPENCER, A. M., FIELDING, A. H., KAMEMOTO, F. I. The relationship between gill Na K-ATPase activity and osmorregulatory capacity in various crabs. **Physiol. Zool.**, v.52, p.1-10. 1979.

STEWART, J. E., CORNICK, J. W., FOLEY, D. M., LI, M. F., BISHOP, C. M. Muscle weighth relationship to serum proteins, hemocytes, and hepatopancreas in the lobster, *Homarus americanus*. **J. Fish. Res. Board. Can.**, v.24, p.2339-2354. 1967.

STRYER, L. **Bioquímica**. 3rd Edition. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1988

TIPTON, K. F. Principles of enzyme assay and kinetic studies. **Enzyme Assays: a Practical Approach**. R. Eisenthal and M. J. Danson. Oxford, IRL Press: 1-58. 1992

TOWLE, D. W. Membrane-bound ATPases in arthropod ion-transporting tissues. **Am. Zool.**, v.24, p.177-185. 1984.

TOWLE, D. W. Ion transport systems in membrane vesicles isolated from crustacean tissues. **J. Exp. Zool.**, v.265, 396, p.387. 1993.

- TOWLE, D. W. Sodium transport systems in gills. In: **Comparative Aspects of sodium Cotransport Systems**, edited by Kinne, R. K. H. Basel, Switzerland: Karger. 241-263. 1990
- TOWLE, D. W. & KAYS, W. T. Basolateral localization of Na⁺/K⁺-ATPase in gill epithelium of two osmorregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. **J. Exp. Zool.** **239**: 311-318. 1986
- TOWLE, D. W. & MANGUN, C. P. Ionic regulation and transport ATPase activities during the molt cycle in the blue crab *Callinectes sapidus*. **J. Crust. Biol.** **5**: 216-222. 1985.
- TOWLE, D. W., RUSHTON, M. E., HEIDYSCH, D., MAGNANI, J. J., ROSE, M. J., AMSTUTZ, A., JORDAN, M. K., SHEARER, D. W., WU, W. S. Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. **J. Exp. Biol.** **200**: 1003-1014. 1997.
- TYSON, G. E. The fine structure of the maxillary gland of the brine shrimp *Artemia salina*: The end sac. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v.86, p.129-138. 1968.
- UENO, M. Calcium transport in crayfish gastrolith disc: morphology of gastrolith disc and ultrahistochemical demonstration of calcium. **J. Exp. Zool.** **213**: 161-171. 1980.
- VAN HEESWIJK, M. P. E., GEERTEN, J. A. M., VAN OS, C. H. Kinetic properties of the ATP-dependent Ca²⁺ pump and the Na⁺/Ca²⁺ exchange system in basolateral membranes from rat kidney cortex. **J. Membrane Biol.** **79**: 19-31. 1984.
- WANSON, S., PÉQUEUX, A., ROER, R. D. Na⁺ regulation and Na⁺, K-ATPase activity in the euryhaline fiddler crab *Uca minax* (Leconte). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.122C, p.121-129. 1984.
- WHEATLY, M. G. An overview of calcium balance in crustaceans. **Physiol. Zool.** **69**: 351-382. 1996
- WHEATLY, M. G. Calcium Homeostasis in Crustacea: the evolving role of branchial, renal, digestive and hypodermal epithelia. **J. Exp. Zool.** **283**: 620-640. 1999
- WHEATLY, M. G., GAO, Y., NADE, M. Integrative aspects of renal epithelial calcium transport in crayfish: temporal and spatial regulation of PMCA. **International Congress Series**, v.1275, p.96-103. 2004.
- WHEATLY, M. G. & HENRY, R. P. Branchial and antennal gland Na⁺/K⁺ dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **J. Exp. Biol.**, v.133, p.73-86. 1987.
- WHEATLY, M. G., HUBBARD, M. G., CORBETT, A. M. A Physiological characterization of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) in hepatopancreatic and antennal gland basolateral membrane vesicles isolated from the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. **Comp. Biochem. Physiol.** **131**: 343-361. 2002.
- WHEATLY, M. G., PENCE, R. C., WEILL, J. R. ATP-dependent calcium uptake into basolateral vesicles from transporting epithelia of intermolt crayfish. **Am J. Physiol**, v.276, p.R566-R574. 1999.

- WHEATLY, M. G. & TOOP, T. Physiological responses of the crayfish *Pacifastus leniusculus* (Dana) to environmental hyperoxia II: the role of the antennal gland. **J. Exp. Biol.**, v.143, p.53-70. 1989.
- WHEATLY, M. G., ZANOTTO, F. P., HUBBARD, M. G. Calcium homeostasis in crustaceans: subcellular Ca dynamics. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.132B, p.163-178. 2002.
- WHEATLY, M. G., ZHANG, Z., WEIL, J. R., ROGERS, J. V., STINER, L. M. Novel subcellular and molecular tools to study Ca^{2+} transport mechanisms during the elusive moulting stages of crustaceans: flow cytometry and polyclonal antibodies. **J. Exp. Biol.**, v.204, p.959-966. 2001.
- WOLCOTT, T. G. Uptake of soil capillary water by ghost crabs. **Nature**, v.264, p.756-757. 1976.
- WOLCOTT, T. G. Uptake of interstitial water from soil: Mechanisms and ecological significance in the ghost crab *Ocypode quadrata* and two gecarcinid crabs. **Physiol. Zool.**, v.57, p.161-184. 1984.
- WOLCOTT, T. G. & WOLCOTT, D. L. Urine reprocessing for salt conservation in terrestrial crabs. **Amer. Zool.** **22**: 897. 1982.
- WOLCOTT, T. G. & WOLCOTT, D. L. Extrarenal modification of urine for ion conservation in ghost crabs, *Ocypode quadrata* Fabricius. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** **91**: 93-107. 1985.
- WOLCOTT, T. G. & WOLCOTT, D. L. Ion conservation by reprocessing of urine in the land crab *Gecarcinus lateralis* (Fremenville). **Physiol. Zool.** **64**: 344-361. 1991.
- ZANOTTO, F. P. & WHEATLY, M. G. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects of physiological regulation. **Comp. Biochem. Physiol.** **133**: 1-15. 2003.
- ZHUANG, Z. & AHEARN, G. A. Ca^{2+} transport processes of lobster hepatopancreas brush border membrane vesicles. **J. Exp. Biol.** **199**: 1195-1208. 1996.
- ZHUANG, Z. & AHEARN, G. A. Energized Ca^{2+} transport by hepatopancreatic basolateral plasma membranes of *Homarus americanus*. **J. Exp. Biol.** **201**: 211-220. 1998.
- ZIEGLER, A., WEIHRAUCH, D., TOWLE, D. W., HAGEDORN, M. Expression of Ca^{2+} -ATPase and Na^+/Ca^{2+} -exchanger is upregulated during epithelial Ca^{2+} transport in hypodermal cells of the isopod *Pocellio scaber*. **Cell. Calcium.** **32**(3): 131-141. 2002.
- ZILLI, L., T., VERRI, T., ZONNO, V., AHEARN, G. A., STORELLI, C., VILELLA, S. Presence of Ca^{2+} channels in hepatopancreatic cells of different crustaceans species. **Pfluegers Arch.**, v.442, p.R17. 2001.

APÊNDICE A – Análise estatística dos resultados obtidos em relação às espécies e os estágios de intermuda e pós-muda

Tabela 12: Variável Dependente: Vmax em glândula antenal

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	8190806,498	2	4095403,249	8,184	,003
estágio	276497,515	1	276497,515	,553	,467
espécie * estágio	762811,512	2	381405,756	,762	,481
Erro	9007995,810	18	500444,212		
Total	30572114,464	24			

Tabela 13: Variável Dependente: Km em glândula antenal

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	,026	2	,013	7,111	,005
estágio	,002	1	,002	1,294	,270
espécie * estágio	,007	2	,003	1,905	,178
Erro	,033	18	,002		
Total	,152	24			

Tabela 14: Variável Dependente: D em glândula antenal

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	273637,192	2	136818,596	6,724	,007
estágio	13147,239	1	13147,239	,646	,432
espécie * estágio	6720,412	2	3360,206	,165	,849
Erro	366253,604	18	20347,422		
Total	1177003,403	24			

Tabela 15: Variável Dependente: Vmax em brânquias

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	150498885,791	2	75249442,896	35,897	,000
estágio	25012,171	1	25012,171	,012	,914
espécie * estágio	371440,106	2	185720,053	,089	,916
Erro	37733040,238	18	2096280,013		
Total	457902552,149	24			

Tabela 16: Variável Dependente: Vo em brânquias

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	1925018,619	2	962509,310	31,939	,000
estágio	16485,167	1	16485,167	,547	,469
espécie * estágio	17941,438	2	8970,719	,298	,746
Erro	542438,998	18	30135,500		
Total	4181097,708	24			

Tabela 17: Variável Dependente: Coeficiente de Hill em brânquias

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	169,211	2	84,605	3,765	,043
estágio	6,522	1	6,522	,290	,597
espécie * estágio	11,979	2	5,989	,267	,769
Erro	404,498	18	22,472		
Total	2751,826	24			

Tabela 18: Variável Dependente: Vmax em hepatopâncreas

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	67649,643	1	67649,643	2,771	,122
estágio	189125,268	1	189125,268	7,747	,017
espécie * estágio	266425,481	1	266425,481	10,913	,006
Erro	292950,471	12	24412,539		
Total	2847150,370	16			

Tabela 19: Variável Dependente: D em hepatopâncreas

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
espécie	6392,446	1	6392,446	10,379	,007
estágio	6404,557	1	6404,557	10,398	,007
espécie * estágio	4650,234	1	4650,234	7,550	,018
Error	7391,144	12	615,929		
Total	39013,099	16			

Tabela 20: Variável Dependente: Coeficiente de Hill em hepatopâncreas

Parâmetro	Soma dos Quadrados Tipo III	df	Média dos Quadrados	F	Sig.
Corrected Model	,096(a)	1	,096	8,032	,030
Intercept	100,621	1	100,621	8435,538	,000
espécie	,000	0	.	.	.
estágio	,096	1	,096	8,032	,030
espécie * estágio	,000	0	.	.	.
Erro	,072	6	,012		
Total	100,788	8			
Corrected Total	,167	7			

a ($R^2 = ,572$ (R^2 ajustado = ,501))