

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Zoologia

**Variações sazonais do metabolismo energético e do balanço oxidativo em
Parastacus brasiliensis promatensis (Crustacea, Decapoda, Parastacidae)**

Ludimila Carneiro Pinheiro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 3320-3500 - Fax: (051) 3339-1564

CEP 90619-900

Porto Alegre – RS - Brasil

2014

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**Variações sazonais do metabolismo energético e do balanço oxidativo em
Parastacus brasiliensis promatensis (Crustacea, Decapoda, Parastacidae)**

Ludimila Carneiro Pinheiro

Orientador(a): Dra. Guendalina Turcato Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE - RS – BRASIL

2014

Sumário

Resumo	5
Abstract.....	8
Apresentação	10
Capítulo I.....	12
Introdução	16
Material e métodos.....	18
Resultados	22
Discussão	25
Referências Bibliográficas	35
Capítulo II.....	46
Resumo:	48
Introdução	49
Material e métodos.....	52
Resultados	56
Discussão	58
Referências bibliográficas.....	65
Conclusões gerais	79
Normas de submissão	80

Ao meu avô Vilmor Carneiro (*In memorian*)

O amor e a saudade serão eternos.

“Way down where the music plays

Way down like a tidal wave

Way down where the fires blaze

Way down, down, way, way on down”

Elvis Presley

Resumo

Os macroinvertebrados bentônicos ocupam uma posição crítica na cadeia alimentar, uma vez que eles são responsáveis pela troca de energia entre os recursos basais e os níveis tróficos superiores. Com o objetivo de analisar o comportamento fisiológico do lagostim *Parastacus brasiliensis promatensis* ao longo do ano, foram coletados 69 indivíduos no mês central de cada estação do ano. Os animais coletados foram medidos quanto ao comprimento de cefalotórax, tendo como critério o valor mínimo 20 mm para captura, após tiveram a hemolinfa retirada em meio contendo oxalato de potássio 10% (anticoagulante) e deixadas em banho de gelo por 24 horas para utilização apenas do plasma nas análises. Após a captura os animais foram sacrificados por crióanestesia. No momento de cada coleta foi obtida uma amostra de água do local de coleta, riacho Garapiá (São Francisco de Paula, RS), para análise dos parâmetros físico-químicos. Em laboratório os indivíduos foram pesados quanto ao peso total e peso tecidual para determinação dos índices de repleção gástrica e hepatossomático (IH), em ambos os gêneros, e gonadossomático (IG) apenas nas fêmeas; como também o grau de repleção gástrico. Na hemolinfa quantificamos, por espectrofotometria, as proteínas, o lactato, os lipídeos, os triglicérides, o glicerol, o colesterol VLDL e o HDL e a glicose. Analisamos ainda o comportamento de três enzimas antioxidantes, sendo elas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione S-transferase (GST); bem como uma medida de dano celular (lipoperoxidação, LPO), com o objetivo de descrever o *status* oxidativo desta subespécie em diferentes estações do ano. Estas análises foram realizadas, por métodos espectrofotométricos, nas brânquias, no hepatopâncreas e no músculo abdominal para ambos os gêneros e, nas gônadas das fêmeas. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguida de Bonferroni ou Kruska-Wallis seguido de Dunn, nos programas SPSS (versão 17.0) ou Bioestat, respectivamente.

As análises estatísticas indicam que houve diferença entre o IH E IG de fêmeas ao longo do período de estudo. Na primavera (pico reprodutivo) observamos um aumento do IG e uma redução do IH, sugerindo alocação das reservas energéticas do hepatopâncreas para as gônadas; hipótese reforçada pela análise do IH em machos, onde não houve diferença significativa. O índice gástrico mostrou uma redução ($p < 0,05$), em ambos os sexos, no inverno o que aliado a uma diminuição da temperatura ambiental e manutenção da glicemia sugerem uma diminuição da taxa metabólica e da exploração do habitat, com possível utilização das reservas endógenas; aliados a uma diminuição do glicerol e proteínas na transição do outono para o inverno. Ambos os gêneros apresentaram diferenças ($p < 0,5$) para os níveis de lactato, com os níveis relacionando-se possivelmente com o baixo teor de oxigênio dissolvido (3,31mg/l) encontrado na água no verão, sendo estes considerados níveis hipóxicos. Houve também um aumento significativo em toda a cadeia lipídica em ambos os sexos; porém, mais pronunciado nas fêmeas, no período que corresponde ao ápice da reprodução, sendo a provável causa o preparo reprodutivo diretamente e/ou o aumento de gasto energético nesta situação.

Quanto ao estresse oxidativo, os resultados sugerem que as fêmeas apresentam um grande gasto energético na proteção do tecido gonadal, principalmente na primavera (ápice da reprodução), mantendo um alto grau de atividade da enzima GST, aliado à menor medida de dano celular (LPO) quando comparado com os demais tecidos. Já para os machos o nível de lipoperoxidação foi maior na primavera, em todos os tecidos. Contudo, o tecido branquial se mostrou incapaz de aumentar a atividade antioxidante, sendo apenas o músculo e o hepatopâncreas capazes de incrementarem as defesas enzimáticas na primavera.

Podemos concluir que fatores sazonais influenciam claramente o ciclo biológico de *P. brasiliensis promatensis* e demandam ajustes no balanço oxidativo, exigindo uma demanda maior das defesas antioxidantes enzimáticas e do sistema metabólico.

Palavras-chave: Parastacus, lagostim, metabolismo, estresse oxidativo.

Abstract

Benthic macroinvertebrates occupy a critical position in the food chain, since they are responsible for the exchange of energy between basal resources and higher trophic levels. In order to analyze the physiological behavior of the species throughout the year, we collected 69 individuals of *Parastacus brasiliensis promatensis* in the central month of each season. The animals collected were measured for carapace length, taking as a criterion the minimum value for capture 20mm after hemolymph were removed in medium containing 10% potassium oxalate (anticoagulant) and left on ice for 24 hours to use only plasma in the analyzes. After capturing the animals were sacrificed by Cryoanesthesia. A water sample from Garapiá stream (San Francisco de Paula, RS) for analysis of physical and chemical parameters was collected. In laboratory subjects were weighed on the total weight and tissue weight to determine the rates of gastric fullness and hepatosomatic, in both genders, and gonadosomatic only in females; as well as the degree of gastric fullness. In the hemolymph were quantified by spectrophotometry proteins, lactate, lipids, triglycerides, glycerol, glucose, cholesterol, VLDL e HDL and glucose. Also analyzed the behavior of three antioxidant enzymes, which were superoxide dismutase, catalase and glutathione s-transferase; as well as a cellular damage measure (lipid peroxidation), in order to describe the oxidative *status* of this subspecies in different seasons. These analyzes were performed by spectrophotometric methods, gills, in hepatopancreas and abdominal muscle for both genders and in the gonads in females. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni or Kruska-Wallis followed by Dunn (17.0 SPSS- or Bioestat).

The statistical analysis indicated that there was difference between IH and IG of females throughout the study period. In the spring (reproductive peak) observed an

increase in the IG and reduced IH, suggesting allocation of energy hepatopancreas reserves to the gonads; hypothesis reinforced by the analysis of IH in males, where there was no significant difference. Gastric index showed a reduction ($p < 0.05$) in both sexes, in winter which combined with a decrease in ambient temperature and blood glucose control suggest a decreased metabolic rate and habitat exploitation, with possible use of endogenous reserves; combined with a decrease in glycerol and protein in the autumn transition to winter. Both genders showed differences ($p < 0.5$) for lactate levels, as levels possibly linking up with low dissolved oxygen content (3,31 mg / l) in the summer. There was also a significant increase across the lipid chain in both sexes but more pronounced in females in the period corresponding to the apex of reproduction, and the probable cause reproductive preparation directly or increased energy expenditure in this situation.

As for oxidative stress, the results suggest that females have a large energy expenditure in protecting the gonadal tissue, especially in the spring (playback apex) while maintaining a high degree of GST enzyme activity, together with the lesser extent of cellular damage when compared with the other tissues. As for the males lipid peroxidation level was higher in the spring, in all tissues. However, the gill tissue proved unable to increase antioxidant activity, and only the muscle and hepatopancreas were able to increase the enzymatic defense in the spring.

We can conclude that seasonal factors clearly influence the biological cycle of *P. brasiliensis promatensis* and demand adjustments in the oxidative balance, requiring a greater demand of enzymatic antioxidant defenses and of the metabolic system.

Keywords: *Parastacus*, crayfish, metabolism, oxidative stress.

Apresentação

O presente estudo buscou avaliar o comportamento metabólico de *Parastacus brasiliensis promatensis*, lagostim de água doce, em ambiente livre de impactos antrópicos diretos, contribuindo de forma direta para a maior compreensão sobre os fatores naturais que atuam de forma determinante na manutenção do ciclo biológico destes animais.

Dois artigos foram organizados com os resultados obtidos neste estudo e compõe o corpo desta dissertação, correspondendo ao capítulo I e II.

O capítulo I foi intitulado: “Efeitos das variações sazonais de metabólitos plasmáticos e índices corporais de *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda).” Neste trabalho foram analisados metabólitos plasmáticos de machos e fêmeas, ao longo do ano, bem como os índices hepatossomático (em ambos os gêneros), gonadossomático (somente em fêmeas) e de repleção estomacal. Este artigo será submetido, após análise e contribuição da banca avaliadora deste mestrado, à revista *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, a qual é Qualis A2 na plataforma Capes na área de Biodiversidade.

O capítulo II foi intitulado: “Estudo do *status* oxidativo em diferentes tecidos de *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda) ao longo de um ciclo sazonal”. Neste capítulo analisamos o *status* oxidativo, de forma sazonal, em quatro tecidos, sendo eles: brânquias, músculo abdominal, hepatopâncreas e gônadas, fazendo distinção entre os sexos para os tecidos, exceto para o tecido gonadal, o qual foi analisado apenas em fêmeas. Para tal estudo utilizamos como indicadores do *status* oxidativo três enzimas antioxidantes (Superóxido Dismutase, Catalase e Glutathione S-transferase) e a medida de lipoperoxidação. Este artigo será submetido à *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, o qual é

Qualis B1 na plataforma Capes na área de Biodiversidade, após análise e contribuição da banca avaliadora.

Capítulo I

Efeito das variações sazonais de metabólitos plasmáticos e de índices corporais de *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea Decapoda)

Ludimila Carneiro Pinheiro¹ e Guendalina Turcato Oliveira^{1,2, *}

¹Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação, Porto Alegre, RS, CEP 90619-900; ²Bolsista de Produtividade do CNPq

Este artigo contém 1 tabela, 4 figuras

Título abreviado: Variação metabólica de *P. brasiliensis promatensis*.

* *correspondência para:* Dra. Guendalina Turcato Oliveira
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS
Faculdade de Biociências
Departamento de Ciências Morfofisiológicas
Laboratório de Fisiologia da Conservação
Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250
CP. 1429
Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil
Phone: 55-51-33203545 (ext. 8324), Fax 55-51-3320-3612
e-mail: G.T.Oliveira (guendato@pucrs.br)

Resumo:

Com o objetivo de traçar o perfil metabólico anual de *P. brasiliensis promatensis* foram coletados 69 indivíduos em ambiente límnic conservado, entre 2013 e 2014. A hemolinfa foi utilizada para as quantificações bioquímicas de proteínas, glicose, lactato, lipídios totais, triglicerídeos, glicerol, colesterol total, VLDL e HDL, por métodos espectrofotométricos. Foram pesados os indivíduos (peso total) e os tecidos para determinação dos índices hepatossomático (IH), gonadossomático (IG) (em fêmeas) e de repleção estomacal. As análises estatísticas indicam que houve diferença ($p < 0,05$) entre o IH e IG de fêmeas, como uma diminuição do IH e incremento do IG na primavera. Em ambos os sexos houve um incremento em toda a série lipídica durante a primavera, com exceção do glicerol. Estes dados indicam uma maior alocação energética dos tecidos para as gônadas durante o pico reprodutivo, nas fêmeas, e comportamentos reprodutivos, nos machos. O aumento dos níveis de lactato parece estar relacionado com os menores valores de oxigênio dissolvido na água, verificados no verão (3,31mg/l). O índice gástrico mostrou uma redução ($p < 0,05$), em ambos os sexos, no inverno o que aliado a uma diminuição da temperatura ambiental e manutenção da glicemia sugerem uma diminuição da taxa metabólica e da exploração do habitat, com possível utilização das reservas endógenas; conjugado a uma diminuição do glicerol e das proteínas na transição do outono para o inverno. A partir destes resultados evidenciamos que o período de reprodução da espécie, primavera e verão, demanda uma alta alocação energética para que estes animais tenham sucesso na reprodução; no inverno, o uso de parte das reservas lipídicas e proteicas aliado a uma diminuição da taxa metabólica garantem a manutenção da homeostase e a sobrevivência dos animais. Tal conjunto de respostas possivelmente torna estes lagostins mais

vulneráveis a fatores de estresse agregados ao habitat, como por exemplo, alterações antrópicas nestes períodos do ano.

Palavras chaves: Crustacea, *Parastacus brasiliensis promatensis*, metabólitos plasmáticos, índices corporais, reprodução, sazonalidade

Introdução

Dentro do contexto da biodiversidade, os invertebrados ocupam uma posição crítica em teias alimentares de todos os ambientes, fazendo parte da base dos nossos ecossistemas (Stevenson, 2005); sendo assim importante, incrementar o conhecimento das estratégias adaptativas destes animais em termos bioquímico-funcionais, tanto em ambiente natural como em situações de cultivo experimental.

Os lagostins de água doce são encontrados em vários ambientes límnicos como lagos, rios, pântanos, lagoas temporárias e estuários. Em especial, dentre os crustáceos, os Parastacidae estão entre os lagostins que apresentam maiores adaptações a ambientes extremos, habitando águas com correnteza escassa ou ausente (Richardson, '83), adaptados a habitats de água fria e com teores variados de oxigênio (Castiglioni *et al.* 2010). O gênero *Parastacus* compreende seis espécies no Brasil, distribuídos principalmente na porção meridional do país. *Parastacus brasiliensis* é a espécie mais amplamente encontrada, principalmente no Rio Grande do Sul (Buckup, 2003). Estes animais têm hábito noturno, deixando suas habitações subterrâneas para se alimentarem no interior da água ou nos ambientes emersos mais próximos (Buckup e Rossi, '80).

Em 2008, foi descrita a subespécie *P. brasiliensis promatensis* Fontoura e Conter, 2008, coletado a 850 m do nível do mar, no município de São Francisco de Paula-RS, estabelecendo um novo limite de altitude para o gênero no Rio Grande do Sul.

Fontoura e Buckup ('89) verificaram que a reprodução em *Parastacus brasiliensis* tem duas fases distintas. A primeira que vai de setembro a janeiro e é caracterizada pela postura e incubação dos ovos junto aos pleópodos. A segunda ocorre após a eclosão dos juvenis, quando estes permanecem aderidos aos pleópodos da fêmea. Esta fase vai de novembro a fevereiro. Estes dados estão de acordo com o descrito na literatura para a população de *P. brasiliensis promatensis* (Fontoura e Conter, 2008). Os mesmos autores

verificaram ainda que provavelmente devido à latitude a qual se encontra, esta subespécie possui crescimento e maturação precoce, sendo encontrados indivíduos férteis com um ano de vida. Quanto aos hábitos alimentares, *P. brasiliensis promatensis* é descrito como politrófica, com uma dieta baseada principalmente em detritos vegetais.

Variáveis abióticas que flutuam de acordo com as estações do ano como disponibilidade de luz e temperatura são pontos críticos na maioria dos processos ecossistêmicos (Huryn *et al.*, 2014), sendo estes determinantes ao metabolismo em nível de indivíduo. O metabolismo basal pode ser definido como o custo de manter-se vivo, compreendendo os processos dos quais o organismo não pode abrir mão (pelo menos não a longo prazo), não incluindo crescimento ou reprodução (Clarke, '93). Deste modo, o período reprodutivo, a disponibilidade de alimento e o ciclo de muda, para crustáceos, podem determinar um desbalanço na necessidade de gasto energético e reservas energéticas disponíveis.

A ideia central deste estudo é incrementar o conhecimento para o entendimento das estratégias de alocação dos recursos energéticos, visto que estes têm um papel importante no custo da reprodução, crescimento e sobrevivência dos animais. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar as variações sazonais de parâmetros metabólicos plasmáticos e índices corporais em machos e fêmeas de *P. brasiliensis promatensis* ao longo de um ciclo de sazonalidade, relacionando essas variações com aspectos da biologia, com os gêneros e as condições do habitat da espécie.

Material e métodos

Os lagostins foram capturados em um trecho do riacho Garapiá, no município de São Francisco de Paula, (29°29.371' S; 50°13.800' W), o qual se localiza dentro da área do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata. O riacho Garapiá está inserido em meio a confluência das formações vegetais de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Campos de Cima da Serra, situado a 900m de altitude, sendo sua nascente de primeira ordem (Nin *et al.*, 2007). Foram realizadas quatro campanhas amostrais, de outubro de 2013 a agosto de 2014, contemplando o mês central de cada uma das estações do ano a fim de se ter condições mais fiéis às características e particularidades da estação. Para o desenvolvimento deste estudo contamos com autorização do Instituto Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio- 43587) e Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS (n° 13/00352).

Para a captura dos espécimes de *P. brasiliensis promatensis* foram utilizadas 80 armadilhas, que consistiam em garrafas pet de boca cônica invertida e como isca foi utilizado fígado de frango. As armadilhas foram colocadas sempre ao entardecer e retiradas no outro dia no início da manhã, contemplando o horário de maior atividade da espécie (Buckup, 2003); o fígado de frango serve como atrativo aos animais não sendo ingerido de maneira significativa.

Os indivíduos capturados foram previamente medidos quanto ao comprimento do cefalotórax (CC), não sendo utilizados na pesquisa indivíduos com CC inferior a 2,5 cm, sendo este valor estipulado com base nas observações *in loco* em coletas preliminares, afim de utilizar apenas indivíduos aptos a reprodução. Em média 1,5 ml de hemolinfa foram retirados dos animais em meio contendo oxalato de potássio a 10% (anticoagulante) e após, as amostras foram colocadas em tubos cônicos e deixadas por

24 horas em banho de gelo para a decantação dos hemócitos, sendo apenas o plasma coletado, congelado e posteriormente utilizado para as dosagens.

Após, os indivíduos capturados foram eutanasiados em banho de gelo e mantidos a menos 20°C nas dependências do Laboratório de Fisiologia da Conservação (PUCRS) para posterior dissecação, sexagem e pesagem dos tecidos (estômago, hepatopâncreas e gônadas). No total foram estudados 69 animais, sendo 37 machos e 32 fêmeas, todos no período de intermuda (Highnan e Hill, '77).

Durante as campanhas amostrais foram determinados parâmetros das condições abióticas do riacho, sendo eles: temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido através de aparelho multiparâmetros (ASKO). Uma amostra de água do riacho foi coletada e mantida refrigerada para posterior determinação da concentração de matéria orgânica, de nitritos e de nitratos, além da medida de dureza, todos quantificados no Laboratório de Processos Ambientais da PUCRS. As amostragens foram realizadas sempre no período da manhã, ao final da coleta dos animais.

As análises bioquímicas foram realizadas em duplicata, por espectrofotometria, com os resultados expressos em mg/dl de plasma; com exceção de proteínas totais que foram expressas em g/dl de plasma, e lactato que foi expressa em mmol/L.

As proteínas foram quantificadas conforme kit da Labtest (Referência nº 99), tendo como princípio a reação de íons cobre com as ligações peptídicas das proteínas séricas, em um meio de reação alcalino, formando um líquido de coloração púrpura que tem absorvância máxima em 545 nm.

Os níveis de glicose foram quantificados através do método da glicose oxidase com emprego do kit da Labtest (Referência nº 84), onde a glicose oxidase catalisa a reação da glicose formando peróxido de hidrogênio que reage com o 4-aminoantipirina a fenol, sob ação de uma peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento formando

uma antipirilquinona vermelha. A intensidade de coloração formada é proporcional à concentração de glicose na amostra, com absorvância a 500 nm.

A dosagem de lactato (Refência nº 138) foi realizada através do Kit da Labtest, no sentido da formação do piruvato, determinado em absorvância de 340 nm.

Os lipídios totais foram medidos pelo método da sulfofosfovanilina (Frings *et al.*, '72), este método consiste na oxidação dos lipídios celulares a fragmentos pequenos após a digestão química com ácido sulfúrico concentrado quente. Após a adição da solução de vanilina e ácido fosfórico, um complexo vermelho é formado, sendo a intensidade da cor vermelha formada proporcional à concentração de lipídios na amostra, com absorvância à 530nm.

Os triglicerídeos foram quantificados através do kit da Labtest (Referência nº 87), onde a lipoproteína lipase promove a hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol que é convertido, pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Após, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorção em 520 nm. A intensidade de cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos da amostra.

Os níveis de glicerol livre foram quantificados utilizando o Kit da BioAnalises (Referência nº 5360), tendo como base duas reações enzimáticas sem a inclusão de uma hidrólise inicial das lípases. O glicerol é fosforilado pela adenosina-5'-trifosfato (ATP) formando glicerol-1-fosfato (G-1-P) e adenosina-5'-difosfato (ADP) em uma reação catalisada pela gliceroquinase (GK). O G-1-P é oxidado pela enzima glicerol fosfato oxidase (GPO) a dihidroxiacetona fosfato (DAP) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A peroxidase catalisadora do peróxido de hidrogênio acopla-se com a 4-aminoantipirina

(4-AAP) e a Sódio N-etil-N-(3sulfopropil)-m-anisidina (ESPA) para produzir a cor que mostre uma máxima absorvância a 340 nm. O aumento na absorvância a 340 nm é diretamente proporcional a concentração de glicerol livre da amostra.

O colesterol total foi quantificado através do kit da Labtest (Referência nº 76), sendo os ésteres de colesterol hidrolisados pela colesteroesterase até colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pelo colesterol oxidase a colesterol-4-em ona e peróxido de hidrogênio; na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantiripina são oxidados formando a antipirilquinonimina que tem absorvância máxima em 500 nm. A intensidade de cor formada na reação final é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

O colesterol VLDL foi determinado por relação matemática, sendo usado o resultado de triglicerídeos multiplicado por 5.

Os níveis de colesterol HDL (Kit Labtest, Referência nº 13) foram medidos quantitativamente através das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) precipitadas e, após centrifugação, o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL) foi determinado no sobrenadante, com absorvância à 500 nm.

Os índices hepato e gonadossomático foram determinados pelo método descrito por Grant e Tyler (1983) e Vazzoler ('96) pela seguinte formula matemática: (massa do tecido/massa do animal) x 100.

O grau de repleção estomacal foi determinado de acordo com Willians ('81) e Bueno & Buckup (2004), por análise visual do volume de alimento presente no estômago e classificado em seis categorias diferentes:

Classe 1= 0% de repleção;

Classe 2 < de 5% de repleção;

Classe 3 de 5% a 35% de repleção;

Classe 4 de 35% a 65% de repleção;

Classe 5 de 65% a 95% de repleção;

Classe 6 > 95% de repleção.

Para calcular o índice médio de repleção gástrica (IR) foram considerados a massa dos estômagos e a dos animais conforme a seguinte relação matemática:

$IR = W_S / W_T$, onde:

W_S = massa do estômago e W_T = massa total do animal, e

$IR_{médio} = (\sum IR / n)$

Onde: n= número de animais.

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão, analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade através do teste de Levene. Quando os dados apresentaram uma distribuição normal foi feita uma ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni quando o $p > 0,05$ ou Games Howell quando o $p < 0,05$ no teste de Levene. Para a análise comparativa entre machos e fêmeas ao longo do ciclo sazonal foi utilizado Anova de duas vias. Parte das análises foram realizadas no SPSS 20.0 e para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal Wallis com complementar de Dunn, sendo este teste feito através do programa BioEstatic 5.0. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

Resultados

Os dados abióticos das coletas mostram que a maior temperatura da água ocorreu no verão, estação de menor valor de oxigênio dissolvido. Na primavera houve um aumento do oxigênio dissolvido, coincidindo com o maior valor de pH registrado. A

condutividade teve um aumento no outono. A matéria orgânica e o nitrito se mantiveram constantes ao longo das estações, porém tanto o nitrato quanto a dureza se mostraram maiores no outono e no inverno em relação a primavera e verão. um aumento de temperatura no verão coincidindo com a queda de oxigênio dissolvido, os dados obtidos apontam também um aumento da condutividade no outono (Tab. 1); os demais parâmetros parecem se manter constantes ao longo das estações. Como as coletas dos parâmetros abióticos foram pontuais nas estações do ano não podemos realizar uma análise estatística dos mesmos.

Para machos e fêmeas houve um aumento significativo das proteínas totais circulantes no outono, estando estas diminuídas e mantidas constantes nas demais estações do ano (Fig. 1.A).

A glicose apresentou uma tendência de elevação ($p > 0,05$) nos meses de verão, para ambos os sexos, porém não constatamos diferenças significativas entre as estações do ano (Fig. 1.B).

O lactato apresentou valores maiores no verão para ambos os gêneros, no entanto os níveis não foram significativamente diferentes dos níveis de lactato observados na primavera, estando estes valores reduzidos ($p < 0,05$) no outono e no inverno (Fig. 1.C).

Os níveis de lipídios totais em machos apresentaram valores mais elevados na primavera, seguido por uma diminuição no verão, chegando a níveis significativamente mais baixos no inverno. Em fêmeas a primavera também foi à estação onde observamos maiores ($p < 0,05$) concentrações de lipídios totais, seguido por uma queda significativa no verão e manutenção destes níveis no outono e no inverno (Fig. 2.A).

A concentração de triglicerídeos circulantes em machos mostrou um incremento ($p < 0,05$) na primavera seguido de uma diminuição no verão e no inverno, no outono observamos valores similares aos encontrados na primavera. Já nas fêmeas observamos

um pico dos triglicerídeos somente na primavera com valores reduzidos nas demais estações do ano (Fig.2.B)

Para os níveis de glicerol observamos um aumento ($p < 0,05$) no outono, tanto para machos como para fêmeas, alcançando valores cerca de duas vezes maiores quando comparado aos valores registrados na primavera e no inverno. No verão os níveis foram também inferiores como na primavera e no inverno, porém sem diferença significativa (Fig. 2.C).

Para machos, o colesterol total foi mais abundante na primavera, seguido de um declínio gradual e intenso até o inverno; já nas fêmeas o colesterol total foi mais elevado nos meses de primavera e verão, apresentando uma redução de seus níveis no outono (Fig. 2.D).

Os níveis de colesterol VLDL apresentaram um padrão de resposta semelhante aos triglicerídeos; onde para os machos observamos um incremento nos níveis circulantes de VLDL na primavera seguido de outro pico no outono, atingindo assim valores similares aos da primavera e no inverno, estes níveis apresentam-se significativamente reduzidos. As fêmeas mostram um aumento na primavera, seguido por um declínio a partir do verão ($p > 0,05$), sendo esta diminuição significativa apenas no outono e no inverno (Fig. 2.E).

Para o colesterol HDL foi constatado como a mais abundante forma de lipídio circulante, desconsiderando os lipídios totais, na primavera tanto para os machos como para as fêmeas, sendo significativamente menor e constante nas demais estações do ano (Fig. 2.F).

Diferenças no padrão anual de proteínas totais e triglicerídeos foram constadas entre machos e fêmeas, sendo que os demais metabolitos mostraram padrão similar.

O índice hepatossomático apresentou-se constante para machos ao longo de todas as estações; já em fêmeas verificamos os menores valores na primavera e no inverno (Fig. 3.A). O índice gonadossomático apresentou valores mais elevados na primavera, sendo este significativamente superior às outras estações do ano (Fig.3.B).

Para o índice de repleção gástrico observamos uma tendência de aumento no verão e no outono para ambos os sexos, sendo significativa apenas para machos (Fig. 3.C).

Quando analisamos o grau de repleção, representado por classes, em ambos os sexos verificamos que ao longo do ano predominam (de 60 até 100%) de estômagos entre as classes 4 e 6. Na primavera observamos que nos machos 80% dos lagostins coletados estavam na faixa entre 4 e 6 e apenas 20% entre as classes 2 e 3; nos meses de verão estão padrão se altera, onde constatamos nos machos um incremento de estômagos cheios (classe 6) em 75% dos animais coletados; no outono encontramos uma distribuição mais ampla com os estômagos estando classificados nas classes 2, 3, 5, porém com o predomínio da classe 6 (cerca de 40% dos indivíduos); no inverno verificamos 100% dos animais nas classes 4 e 5 (Fig 4 A, B, C e D). Já nas fêmeas 100% se encontravam entre as classes 4 e 6 na primavera; no verão aumenta a diversidade de classes encontradas, onde observamos 10% de animais na classe 1 e 3 e os 90% restantes nas classes 5 e 6; no outono observamos 75% de estômagos na classe 6 e os 25% restantes distribuídos igualmente entre as classes 3 e 5; nos meses de inverno a quantidade de alimento nos estômagos foi igualmente distribuída entre as classes 4 e 5 (Fig 4 E, F, G e H).

Discussão

Como em outras espécies de crustáceos decapodas (Rosa e Nunes, 2003; Dutra *et al.*, 2008; Lane *et al.*, 2010), as fêmeas de *P. brasiliensis promatensis* tem um alto

investimento na maturação gonadal, acarretando assim em uma maior demanda energética. Durante a reprodução ocorre a mobilização das reservas para apoiar o crescimento dos oócitos (Kucharski e da Silva, '91) e de acordo com Dutra *et al.* (2008), ocorre um aumento da concentração de lipídios no hepatopâncreas, bem como o aumento do índice gonadossomático nas fêmeas desta espécie nesta época como também verificado neste trabalho para este índice (IG). Perfil compatível com o ciclo reprodutivo extenso verificado em *P. brasiliensis promatensis*, iniciando na primavera e estendendo-se até meados do verão (Fontoura e Conter, 2008).

Em duas situações a reprodução pode levar a redução da taxa de sobrevivência: (1) quando aumenta a vulnerabilidade a poluentes e outros fatores estressores ou (2) quando a reserva energética é esgotada, limitando a energia disponível para as demais funções bioquímicas (Harshman e Zera, 2007), como a reprodução. *P. brasiliensis promatensis* parece se adaptar a alta demanda energética para o preparo reprodutivo, reforçando esta hipótese observamos um incremento do colesterol HDL ($p < 0,05$) na primavera (Fig. 2.F). O colesterol HDL é o responsável por transportar a gordura dos tecidos para o fígado em vertebrados e possivelmente, para o hepatopâncreas e/ou gônadas em invertebrados; ressaltamos que em crustáceos a síntese de vitelogenina parece ocorrer tanto no hepatopâncreas como nas gônadas (Rosa e Nunes, 2003; Ghanawi e Saoud, 2012). Associado a esta resposta verificamos também valores aumentados de toda a série de lipídios circulantes, o que pode auxiliar na síntese dos hormônios reprodutivos esteroidais, na gametogênese e na síntese de vitelogenina.

A resposta pela qual encontramos elevados valores de todos marcadores lipídicos estudados (lipídios totais, triglicerídeos e colesteróis) principalmente nas fêmeas na primavera (Fig.2), pode estar relacionado a duas situações. A primeira ligada ao preparo reprodutivo diretamente, com o transporte/síntese de vitelogenina para as gônadas. A

vitelogenese é o processo no qual o organismo estoca no ovo o vitelo que contém as reservas necessárias para o desenvolvimento do embrião, constitui um importante mecanismo para a reprodução em crustáceos (Tsukimura, 2001). A vitelogenina de crustáceos é uma glicolipoproteína que tem em sua composição frações de LDL e HDL, além de diferentes proporções de fosfolipídeos, triglicerídeos, proteínas e carotenoides, além de carboidratos (Komatsu *et al.*, '93; Petersen e Anger, '97). A vitelogenina pode ser produzida de forma endógena (nas gônadas), sendo assim chamada de vitelogenese primária, ou exógena (em outros órgãos), sendo chamada de vitelogenese secundária (Ghanawi e Saoud, 2012). A vitelogenese secundária é realizada principalmente no hepatopâncreas, ocorrendo na estação reprodutiva, com necessidade de transporte pela hemolinfa e transferência para as gônadas (Charniaux-Cotton, '85; Tsukimura, 2001). Ferré *et al.* (2011) ao analisar a vitelogenina na hemolinfa, no ovário e no hepatopâncreas de *Cherax quadricarinatus* encontraram os maiores valores de vitelogenina circulantes no pico reprodutivo de *C. quadriculatus*. Estudos futuros visando à quantificação desta glicolipoproteína (vitelogenina) são necessários para uma maior compreensão deste processo em *P. brasiliensis promatensis*.

Outro fator que pode estar relacionado com os altos níveis dos marcadores lipídicos em fêmeas e em machos é o fato de as gorduras serem o principal substrato energético em crustáceos (Rosa e Nunes, 2003). Para os animais é frequente que a relação de consumo e gasto energético entre em desbalanço por períodos limitados de tempo, seja por influência de fatores bióticos ou abióticos, e para manter o *status* metabólico esta reserva energética pode ser mobilizada (Dutra *et al.*, 2008). Lipídios representam a principal fonte de combustível metabólico, assim no período reprodutivo pode existir a necessidade deste substrato estar disponível para os tecidos para sustentar as funções básicas além dos comportamentos reprodutivos, como por exemplo, a busca por um

parceiro reprodutivo, interações agonísticas e cuidados parentais, bem como para a maturação gonadal (Dutra *et al.* 2008; Guerrero e Sandoval, 2012).

O aumento de lipídios na primavera para ambos os sexos de *P. brasiliensis promatensis* (Fig. 2.A) pode indicar que o período reprodutivo determina um momento de maior estresse para os animais, exigindo maior gasto energético (Foucreau *et al.*, 2014). Do mesmo modo, a maior quantidade de triglicerídeos para fêmeas em relação aos machos na primavera (Fig. 2.B) está igualmente relacionada à maior necessidade energética das fêmeas em relação aos machos para a reprodução, visto que estas são responsáveis pela síntese de vitelogenina e de todos os cuidados parentais; onde os ovos/embriões são incubados no abdômen aderidos e protegidos pelos pleiópodos e, com os juvenis que ao eclodirem permanecem nos pleiópodos até tornarem-se independentes (fase de maturação juvenil) para explorarem o habitat. Tal fato já foi relatado por Fontoura e Buckup ('89).

Estes dados indicam que machos e fêmeas fazem um grande investimento energético na época reprodutiva, sendo este mais expressivo em fêmeas, mas sem diferença significativa quando analisamos os parâmetros hemolinfáticos; o que pode conduzir a uma maior suscetibilidade destes lagostins neste período a outros fatores estressantes, como por exemplo, alterações ambientais.

Os resultados dos triglicerídeos circulantes reforçam esta afirmativa (Fig. 2.B), uma vez que esta é a principal forma que os lipídios assumem para armazenamento de energia (Gurr, 2002). Ciaramella *et al.* (2014) descreve que para o lagostim *Homarus americanus*, os triglicerídeos circulantes estão também relacionados com o período de muda no qual os machos se encontram, não sendo esta correlação verdadeira para fêmeas. Ciaramella *et al.* (2014) ainda comenta que fêmeas em fase reprodutiva evitam a muda. Estas informações podem indicar uma provável causa do aumento de

triglicerídeos circulantes apenas em machos no outono, assim sugerimos que os machos capturados neste período estejam em fase final de intermuda. Já as fêmeas por estarem começando o preparo gonadal para o próximo ciclo reprodutivo não apresentam este padrão; assim as fêmeas, em início de maturação sexual não utilizariam os triglicerídeos, em abundância na hemolinfa, para este processo neste momento; sendo mais utilizados os lipídios polares, como o colesterol, por serem utilizados para funções estruturais (membrana plasmática) e síntese de hormônios reprodutivos (Nelson e Cox, 2006).

O colesterol VLDL aumentou significativamente no outono, mostrando um padrão de resposta similar ao glicerol em ambos os gêneros e a dos triglicerídeos em machos (Fig.2 E). O colesterol VLDL é uma lipoproteína de transporte de triglicerídeos e colesterol, o que nos permite sugerir que possivelmente estes metabolitos estão sendo transferidos do hepatopâncreas, sítio de absorção, para os tecidos onde são armazenados para serem utilizados. Nas fêmeas podemos observar 60% dos estômagos distribuídos entre as classes 5 (médio a cheio) e 6 (cheio) e, nos machos estes valores atingem 75% dos animais apresentando estômagos cheios (classe 6) o que reforça a hipótese de atividade alimentar intensa e assim transferência de nutrientes do órgão de absorção (hepatopâncreas) para os tecidos, aliado a um aumento do índice médio de repleção gástrico (Fig. 4 e 3C) observados no outono.

Podemos supor que nos meses de inverno, onde a temperatura da água é baixa (Tabela 1), os animais apresentem uma diminuição da atividade exploratória e de seu metabolismo utilizando assim as reservas endógenas para manterem a homeostase energética e os níveis glicêmicos. Nesta estação (inverno) verificamos os mais baixos valores de glicose na hemolinfa em ambos os sexos (Fig. 1.B). Trabalhos com outras espécies de crustáceos mostram que estes apresentam um encurtamento do período de

atividade e diminuição do metabolismo nos meses de inverno com o uso principalmente, das reservas endógenas (Kucharski e da Silva, '91; Oliveira *et al.*, 2003; Vinagre *et al.*, 2006). Esta hipótese é reforçada pelos mais baixos valores do índice médio de repleção gástrico (Fig. 3C) encontrado e também, pela ausência de animais com estômagos cheios (classe 6) em ambos os sexos (Fig. 4).

Já na primavera, período de alta demanda energética devido à reprodução, estes lipídios podem ser alocados do trato digestório, reforçado pela tendência de aumento do índice de repleção gástrico nesta estação em relação ao inverno (Fig.3C) e o grau de repleção (Fig. 4), estando assim elevados na hemolinfa. Este padrão de resposta dos triglicerídeos e VLDL verificados na primavera sugere uma maior atividade dos animais na busca por alimento e/ou a ingestão de um alimento com maior teor de gorduras. Os resultados de HDL também sugerem uma realocação das reservas energéticas, que são removidas dos tecidos e/ou trato digestório para as gônadas (aumento do índice gonadossomático) no período reprodutivo.

Em situações de boa alimentação glicose é armazenado na forma de glicogênio e o excesso de nutrientes é convertido em triacilglicerídeos, no qual o glicerol atua como precursor para estes metabólitos que vão formar as reservas energéticas e serão transportados pela hemolinfa (Chaves *et al.*, 2012). O aumento das proteínas e do glicerol circulante no outono pode estar relacionado com uma maior atividade alimentar e com a manutenção dos níveis de glicose na hemolinfa verificado no inverno, sendo estes metabólitos captados e utilizados na gliconeogenese e gliceroneogenese, respectivamente, para manter os níveis glicêmicos e assim a homeostase. A redução dos níveis proteicos circulantes (Fig.1.A) após o inverno reforça esta hipótese; além disto, estas proteínas devem também estar sendo alocadas ao tecido reprodutivo preparando a espécie para o pico de reprodução que ocorre na primavera. Oliveira e Da Silva ('97) e

Schein *et al.* (2005) provaram a presença de capacidade gliconeogênica em diversos tecidos (hepatopâncreas, brânquias e músculo) de uma espécie de caranguejo estuarino.

Quando analisamos o grau de repleção, representado por classes, em ambos os sexos verificamos que ao longo do ano predominam (de 60 até 100%) estômagos entre as classes 4 e 6, evidenciado a manutenção de um alto grau de atividade alimentar e/ou um processo digestório lento. Estudos sobre os hábitos alimentares de Parastacidae mostram que estes animais são politróficos, sendo ao mesmo tempo herbívoros, onívoros e detritívoros, sua dieta consiste principalmente de detritos de origem vegetal (Buckup e Rossi, '80) o que pode tornar o processo digestório extremamente lento.

O lactato é o produto resultante da obtenção de energia por glicólise; o seu aumento está amplamente relacionado com o aumento da respiração anaeróbica, padrão encontrado principalmente em situação de hipóxia ambiental. Os dados abióticos sugerem uma situação de hipóxia moderada no verão no riacho Garapiá (Tabela 1), padrão também ressaltado por Dutra *et al.* (2008) e Conter (2000), sendo esta a provável causa do aumento significativo de lactato para ambos os gêneros de *P. brasiliensis* e *P. promatensis* nesta estação (Fig. 1.C). Segundo Zuin *et al.* (2009) a redução de oxigênio dissolvido é encontrada quando há um aumento considerável de matéria orgânica introduzida no corpo d'água, o que acarretaria em maior disponibilidade de alimento para os microrganismos levando a aumento do consumo de oxigênio e a diminuição de sua disponibilidade no habitat.

Os níveis de lactato se mostraram significativamente superior também na primavera em relação ao outono e inverno (maiores níveis de oxigênio dissolvido, Tabela 1). Na primavera ocorre o pico reprodutivo da espécie (Buckup *et al.*, 2003; Fontoura e Conter, 2008) e é neste período que o comportamento de busca ativa das fêmeas pelos machos e interações agonísticas entre machos se mostram mais evidentes, podendo conduzir ao

uso mais intenso de glicogênio do músculo e assim a formação maior de lactato. Dutra *et al.* (2008) verificaram uma diminuição deste polissacarídeo nos meses de primavera e verão nesta mesma espécie de lagostim. Confrontos entre animais da mesma espécie por espaço e recursos geralmente termina com simples sinais de desistência de um dos lados, porém este comportamento gera um gasto energético que pode ser associado à depleção de reservas energéticas e ao aumento do lactato (Briffa e Elwood, 2001).

A menor concentração de lipídios totais de machos em relação a fêmeas no verão, e similar índice de repleção gástrica, sustentam a hipótese de um gasto energético maior em machos. Lane *et al.* (2010) sugerem que em esquilos, a demanda energética requerida pela reprodução é similar em machos e fêmeas, uma vez que, enquanto fêmeas tem um alto investimento no aparelho reprodutor, machos tem um alto gasto para atrair e defender sua parceira.

A diminuição de lactato circulante verificada no outono e no inverno sugere o a utilização desta molécula pela via gliconeogênica e assim, o restabelecimento das reservas de glicogênio nos tecidos e a manutenção da glicemia dos lagostins, outros trabalhos mostram o uso desta molécula pela via gliconeogênica em caranguejos (Oliveira e Da Silva, '97).

Os índices de hepato e gonadossomático deixam claro o preparo das fêmeas para a reprodução; onde aparentemente o hepatopâncreas aloca parte de suas reservas energéticas para as gônadas (Fig.3 A e B), visto que temos o maior IG coincidindo com o menor IH de fêmeas ($p < 0,05$), enquanto o IH não sofreu alterações para machos ($p > 0,05$).

Em um estudo realizado com fêmeas de outra espécie de lagostim, o parastacídeo *Cherax quadricarinatus*, analisando o desenvolvimento das gônadas foi relatado que no período de maturação houve maiores concentrações de proteínas e lipídios nas gônadas,

seguido por queda significativa na concentração de lipídios no hepatopâncreas (Rodriguez Gonzalez *et al.*, 2006). Porém não foi verificada redução nos níveis de proteínas no hepatopâncreas. Este dado pode ajudar a compreender os resultados obtidos para *P. brasiliensis promatensis*, no qual os níveis de proteínas da hemolinfa estavam reduzidos para machos e fêmeas na primavera, já para os níveis de lipídios observamos as maiores concentrações. Castiglioni *et al.* (2007), verificaram que em *Parastacus varicosus* há uma acentuada redução na concentração de proteínas na hemolinfa no verão em ambos os sexos, estação que coincide com o pico reprodutivo desta espécie. Isto sugere que é necessário um aporte de proteínas para o desenvolvimento gonadal, sendo esta suprida pela hemolinfa oriunda dos tecidos e da alimentação, enquanto os lipídios podem estar sendo alocados do hepatopâncreas para as gônadas, corroborando com a diminuição do índice hepatossomático, em ambos os gêneros, aliado a um aumento do índice gonadossomático nas fêmeas durante a estação reprodutiva de *P. brasiliensis promatensis*.

A população alvo deste estudo já foi previamente estudada por Dutra *et al.* (2008), porém as análises realizadas na hemolinfa foram restritas a determinação dos níveis de glicose, proteínas totais, lipídios totais e triglicerídeos; estes mesmos parâmetros analisados na hemolinfa foram comparados com os valores obtidos nos músculos, brânquias e hepatopâncreas. Contudo, ressaltamos que os animais não foram separados quanto ao sexo.

Os resultados obtidos para lipídios totais e glicose estão de acordo com os encontrados por Dutra *et al.* (2008); já para as proteínas e triglicerídeos observamos um padrão sazonal distinto. Porém, no caso das proteínas os valores brutos obtidos foram semelhantes, variando de 4,3 a 8,8 mg/dl no estudo realizado em 2008 e de 2,87 a 7,5 mg/dl no presente estudo. Estes dados indicam possivelmente, uma dieta rica em

proteínas (Oliveira *et al.*, 2004). Dietas a base de proteínas podem fornecer vantagens aos animais, sendo já constatado por Roeder e Behmer (2014), em um estudo com *Heliothis virescens*, popularmente conhecida como lagarta da maçã, que dietas levemente mais ricas em proteínas aumentam a sobrevivência de larvas e a eclosão de ovos. É válido ressaltar novamente que o trabalho realizado em 2008 por Dutra *et al.* não fez distinção alguma de machos e fêmeas, sendo este um fator determinante para as diferenças encontradas quanto as proteínas totais e triglicédeos.

A partir deste conjunto de resultados podemos destacar que o período de reprodução da espécie, primavera e verão, demanda uma alta alocação energética para que estes animais tenham sucesso na reprodução o que possivelmente os torna mais vulneráveis a fatores de estresse agregados ao habitat, como por exemplo, alterações antrópicas; assim estudos futuros visando o entendimento do *status* oxidativo em machos e fêmeas oriundos de um ambiente não alterado e alterado podem reforçar esta hipótese permitindo o uso desta espécie como uma indicadora da qualidade de água ambiental. Esta demanda parece não influenciar no metabolismo apenas na primavera, ápice do período reprodutivo, e sim ao longo de todo o ano, seja se recuperando ou se preparando para um novo ciclo reprodutivo; além disto, fatores como disponibilidade/tipo de alimento, temperatura, oxigênio dissolvido, entre outros, que variam sazonalmente parecem influenciar o padrão metabólico dos animais.

Agradecimentos:

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa durante o período desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

Adams SM, McLean RB. 1985. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *J Fish Biol* 26(2):111-126.

Audet D, Couture P. 2003. Seasonal variations in tissue metabolic capacities of yellow perch (*Perca flavescens*) from clean and metal-contaminated environments. *Can J Fish Aquat Sci* 60(3): 269-278.

Briffa M, Elwood RW. 2001. Decision rules, energy metabolism and vigour of hermit-crab fights. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268:1841-1848.

Buckup L. 2003. Família Parastacidae. Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil. Edições Loyola, São Paulo, SP, Brasil, 117-141.

Bueno AAP e Buckup, BB. 2004. Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup & Buckup (Crustacea, Decapoda, Aeglidae) from Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia* 16(2): 115-127.

Carey C. 2005. How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. *Integr Comp Biol* 45(1): 4-11.

Charniaux-Cotton H. 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. *Am Zool* 25(1): 197-206.

Chaves VE, Frasson D, Garófalo MA, Navegantes LC, Migliorini RH, Kettelhut IC. 2012. Increased Glyceride-Glycerol Synthesis in Liver and Brown Adipose Tissue of Rat: In-Vivo Contribution of Glycolysis and Glyceroneogenesis. *Lipids*, 47(80): 773-780.

Ciaramella MA, Battison AL, Horney B. 2014. Measurement of tissue lipid reserves in the American lobster (*Homarus americanus*): hemolymph metabolites as potential biomarkers of nutritional status. *J Crustacean Biol* 34(5): 629-638.

Clarke A. 1993. Seasonal acclimatization and latitudinal compensation in metabolism: do they exist? *Funct Ecol* 139-149.

da Silva-Castiglioni, D., Kaiser Dutra, B., Oliveira, G. T., & Bond Buckup, G. 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148(1), 204-213.

da Silva-Castiglioni D, Oliveira GT, Buckup L. 2010. Metabolic responses of *Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) to hypoxia. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 156(4), 436-444.

Dutra BK, Zank C, Silva KMD, Conter MR, Oliveira GT. 2008. Seasonal variations in the intermediate metabolism of the crayfish *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) in the natural environment and experimental culture. *Iheringia Ser. Zool.* 98(3): 355-361.

Ferré LE, Medesani DA, García CF, Grodzielski M, Rodríguez EM. 2012. Vitellogenin levels in hemolymph, ovary and hepatopancreas of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) during the reproductive cycle. *Rev Biol Trop* 60(1): 253-261.

Fontoura NF, Conter MR. 2008. Description of a new subspecies of the crayfish *Parastacus brasiliensis* (Von Martens, 1869) from São Francisco de Paula, RS, Brazil (Decapoda, Parastacidae). *Zootaxa*, 1849: 28-34.

Fontoura NF, Buckup L. 1989. Dinâmica populacional e reprodução em *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Rev Bras Biol*, 49(4): 911-921.

Foucreau N, Cottin D, Piscart C, Hervant F. 2014. Physiological and metabolic responses to rising temperature in *Gammarus pulex* (Crustacea) populations living under continental or Mediterranean climates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 168: 69-75.

Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clinical Chemistry*, 18(7): 673-674.

Ghanawi J, Saoud IP. 2012. Molting, reproductive biology, and hatchery management of redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus* (von Martens 1868). *Aquaculture*, 358: 183-195.

Grant A, Tyler PA. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6:259-269.

Guerrero MG, Sandoval PH. 2012. Total protein, lipid, carbohydrate, and water changes of eggs through embryonic development of *Macrobrachium occidentale* Holthuis, 1950 and its relation to morphological changes. *Journal of Crustacean Biology*, 32(5): 769-773.

Gurr MI, Harwood JL, Frayn KN. 2002. *Lipid Biochemistry*. Blackwell, Malden, MA.

Harshman LG, Zera AJ. 2007. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol Evol*, 22(2): 80-86.

Highnam KC, Hill L. 1977. *The comparative Endocrinology of the invertebrates*. American Elsevier Publishing. 357 p.

Hury AD, Benstead JP, Parker SM. 2014. Seasonal changes in light availability modify the temperature dependence of ecosystem metabolism in an arctic stream. *Ecology* 95(10): 2826-2839.

Koenig S, Solé M. 2012. Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Mar Environ Res* 79: 122-131.

Komatsu M, Ando S, Teshima SI. 1993. Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of crustacea. *J Exp Zool* 266(4): 257-265.

Kucharski LCR, Da Silva RSM. 1991. Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 99(1): 215-218.

Lane JE, Boutin S, Speakman JR, Humphries MM. 2010. Energetic costs of male reproduction in a scramble competition mating system. *J Anim Ecol* 79(1): 27-34.

Leonard WR, Levy SB, Tarskaia LA, Klimova TM, Fedorova VI, Baltakhinova ME, Krivoshapkin VG, Snodgrass JJ. 2014. Seasonal variation in basal metabolic rates among the yakut (Sakha) of Northeastern Siberia. *Am J Hum Biol* 26(4): 437-445.

Nelson DL, Cox MM. 2006. *Lehninger princípios de bioquímica*. Omega.

Newsholme EA, Taylor K. 1969. Glycerol kinase activities in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. J* 112: 465-474.

Nin CS, Ruppenthal EL, Rodrigues GG. 2007. Vegetação ripária e suas funções ecológicas referentes à produção de folhiços em cursos de água, São Francisco de Paula, RS. *Rev Bras Biocienc* 5:861-863.

Oliveira GT, Da Silva RS. 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118(4): 1429-1435.

Oliveira GT, Eichler P, Rossi IC, Da Silva RS. 2004. Hepatopancreas gluconeogenesis during anoxia and post-anoxia recovery in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 301(3): 240-248.

Petersen, S., & Anger, K. (1997). Chemical and physiological changes during the embryonic development of the spider crab, *Hyas araneus* (Decapoda: Majidae). *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 117(2): 299-306.

Richardson, AMM. The effect of the burrows of a crayfish on the respiration of the surrounding soil. *Soil Biol Biochem* 15: 239-242, 1983

Ricklefs RE, Wikelski M. 2002. The physiology/life-history nexus. *Trends Ecol Evol* 17(10): 462-468.

Rodríguez-González H, Hernández-Llamas A, Villarreal H, Saucedo PE, García-Ulloa M, Rodríguez-Jaramillo C. 2006. Gonadal development and biochemical composition of female crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) in relation to the Gonadosomatic Index at first maturation. *Aquaculture* 254(1): 637-645.

Roeder KA, Behmer ST. 2014. Lifetime consequences of food protein-carbohydrate content for an insect herbivore. *Funct Ecol* 28(5): 1134-1143.

Rosa RA, Nunes ML. 2003. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. *Crustaceana* 75: 1095–1105.

Seddon WL, Prosser CL. 1997. Seasonal variations in the temperature acclimation response of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Physiol Zool*, 33-44.

Schein V, Chittó ALF, Etges R, Kucharski LC, Van Wormhoudt A, Da Silva RS. 2005. Effects of hypo-or hyperosmotic stress on gluconeogenesis, phosphoenolpyruvate carboxykinase activity, and gene expression in jaw muscle of the crab *Chasmagnathus granulata*: seasonal differences. *J Exp Mar Bio Ecol* 316(2): 203-212.

Stevenson RD, Tuberty SR, Wingfield JC. 2005. Ecophysiology and conservation: the contribution of endocrinology and immunology—introduction to the symposium. *Integr Comp Biol* 45(1): 1-3.

Tsukimura B. 2001. Crustacean vitellogenesis: its role in oocyte development. *Society of Zoologists*. 41(3): 465-476.

Vazzoler ADM. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringa, Universidade Estadual de Maringa.

Williams, M. J. (1981). Methods for analysis of natural diet in portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *J Exp Mar Bio Ecol* 52(1): 103-113.

Zuin VG, Ioriatti MCS, Matheus CE. 2012. O emprego de parâmetros físicos e químicos para a avaliação da qualidade de águas naturais. *Redes* 1(162).

Tabela 1: Parâmetros abióticos obtidos no Riacho Garapiá no momento da coleta dos animais.

	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Temperatura	16,8°C	20,4°C	15,7°C	13,4°C
pH	9,12	8,41	8,8	6,55
Condutividade	14,2µs	14,43µs	16,74µs	14,64µs
Oxigênio dissolvido	10,66 mg/L	3,31 mg/L	5,19 mg/L	5,70 mg/L
M.O.	0,2 mg/L	0,1 mg/L	0,1 mg/L	0,1 mg/L
Nitrito	0,01 mg/L	0,01 mg/L	0,01 mg/L	0,01 mg/L
Nitrato	0,01 mg/L	0,02 mg/L	0,04 mg/L	0,05 mg/L
Dureza	0,1 mg/L	0,1 mg/L	1,5 mg/L	1,9 mg/L

Figura 1: Concentração de proteínas totais (A), glicose (B) e lactato (C) ao longo de um ciclo sazonal no plasma de *Parastacus brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm o erro padrão da média, onde as barras pretas representam os machos e as brancas às fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. * indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano.

Figura 2: Concentração de lipídios totais (A), triglicerídeos (B), glicerol (C), colesterol total (D), colesterol VLDL (E) e colesterol HDL (F) ao longo de um ciclo sazonal no plasma de *Parastacus brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm o erro padrão da média, onde as barras pretas representam os machos e as brancas às fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. * indica diferença na curva de resposta de machos e fêmeas ao longo do ano.

Figura 3: Índices hepatossomático (A), gonadossomático (B) e de repleção gástrica (C) ao longo de um ciclo sazonal em *Parastacus brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm o erro padrão da média. As barras pretas representam os machos e as brancas as fêmeas. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas.

Figura 4: Distribuição das classes de repleção estomacal nos estômagos dos indivíduos de *Parastacus brasiliensis promatensis* coletados. Os gráficos A, B, C e D representam machos, e E, F, G e H representam fêmeas, correspondendo às estações de primavera, verão, outono e inverno, respectivamente.

Figura 1.

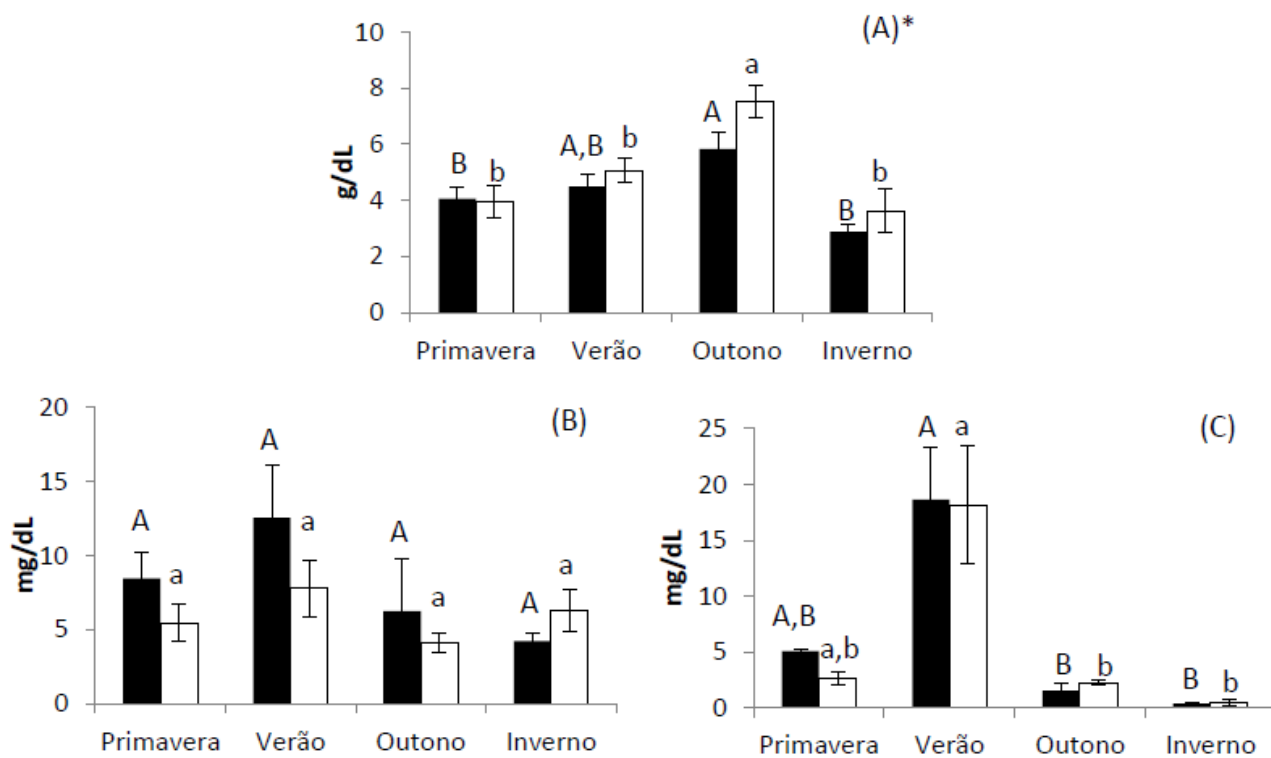


Figura 2.

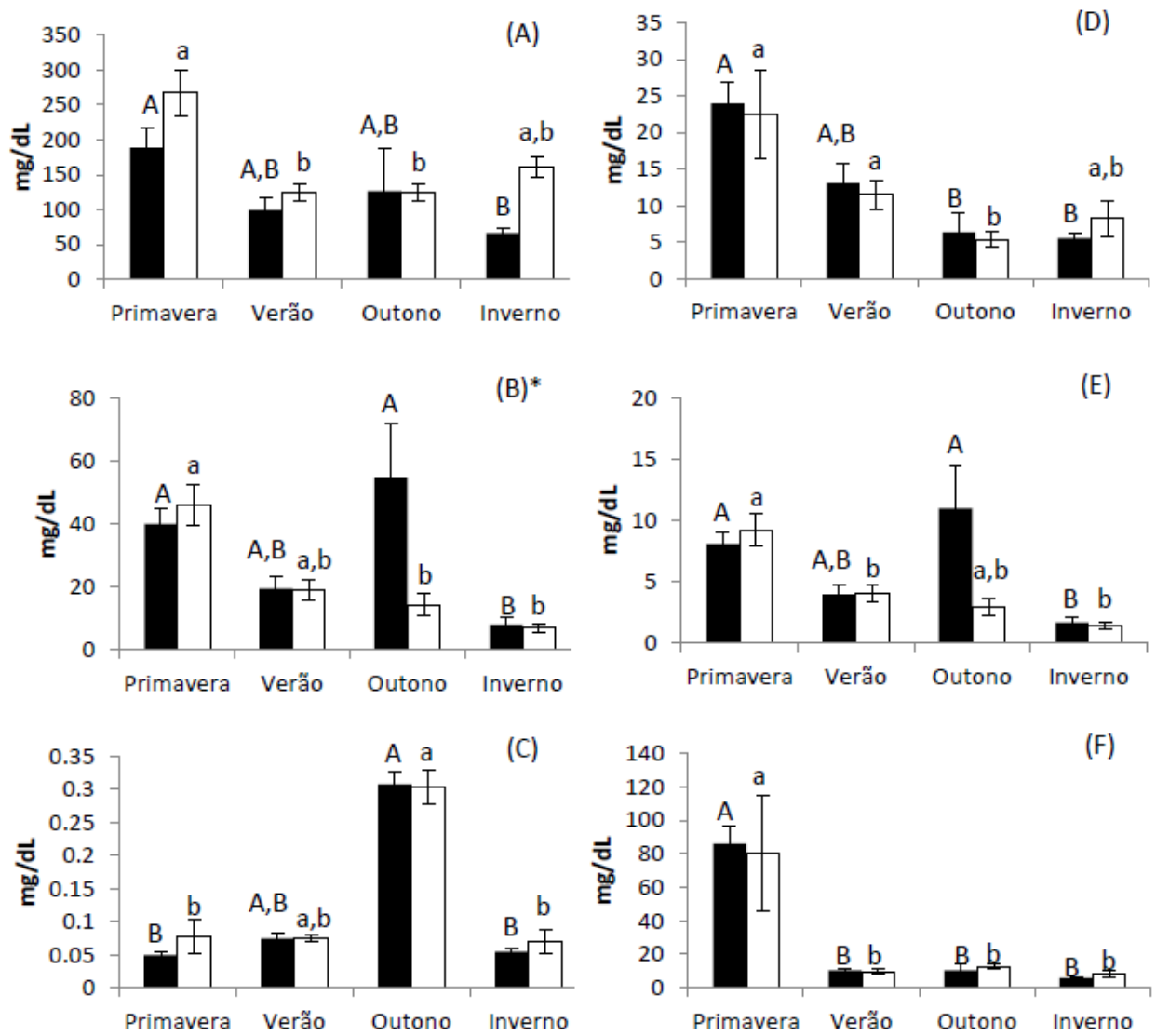


Figura 3.

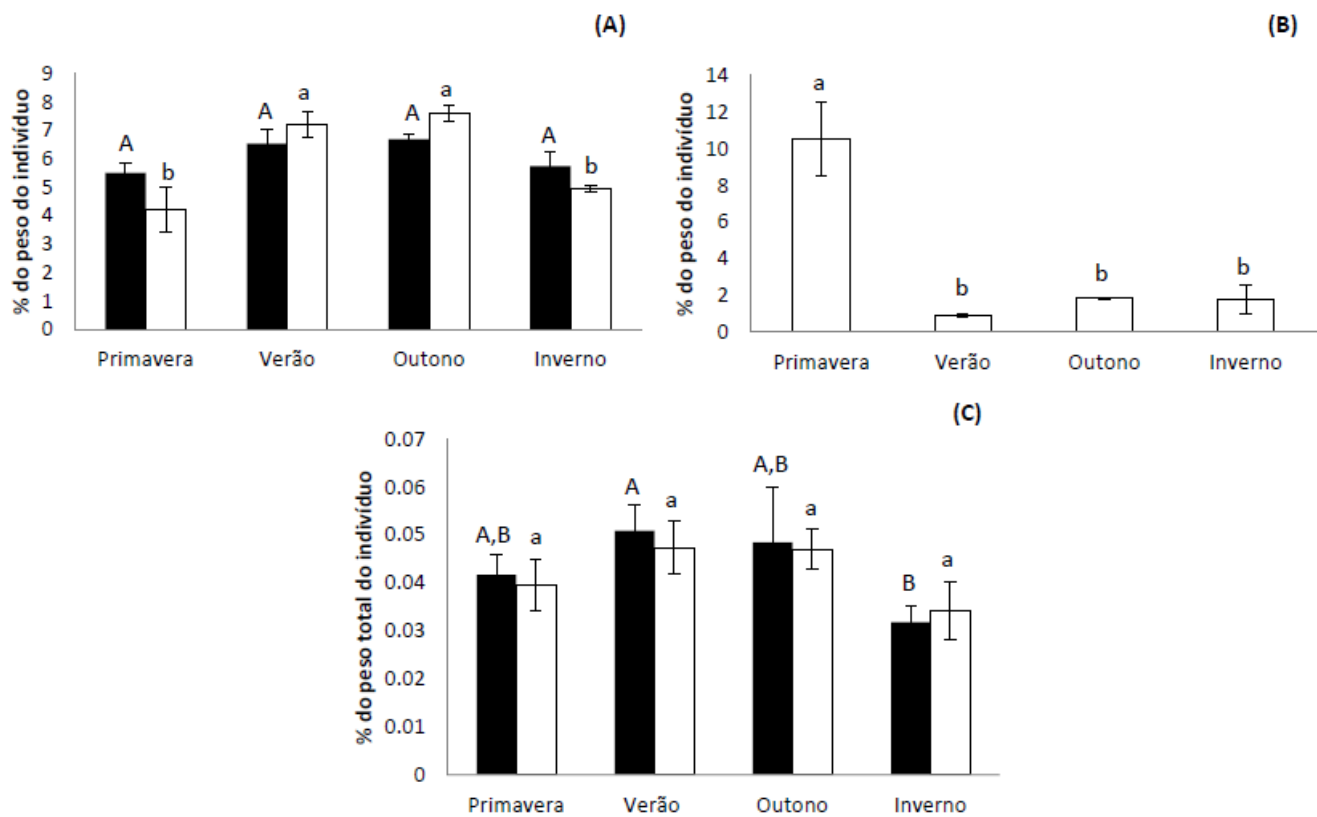
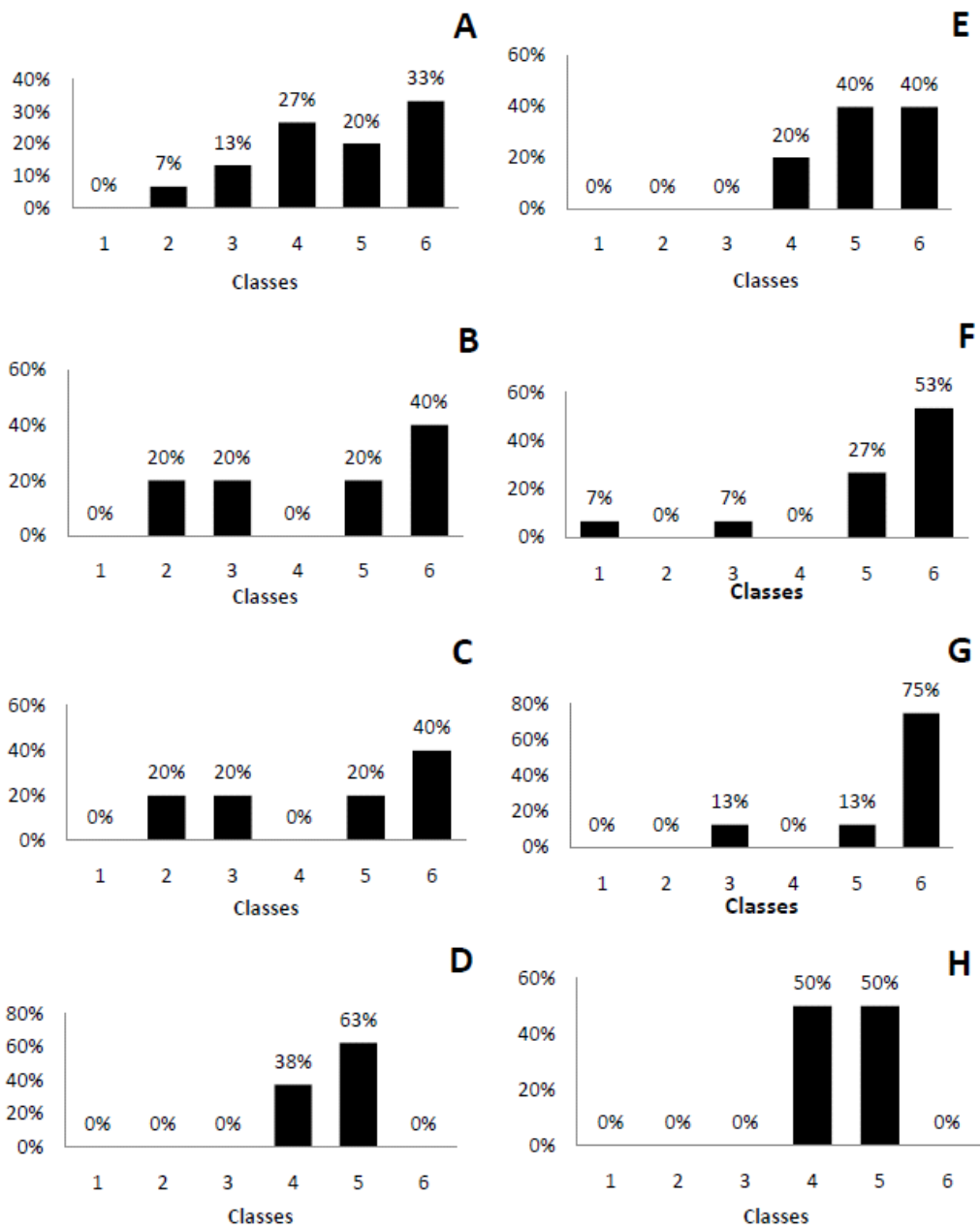


Figura 4



Capítulo II

Perfil do status oxidativo em diferentes tecidos de *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) ao longo de um ciclo sazonal

Ludimila Carneiro Pinheiro¹ e Guendalina Turcato Oliveira^{1,2,*}

¹Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação, Porto Alegre, RS, CEP 90619-900; ²Bolsista de Produtividade do CNPq

Título abreviado: Status oxidativo de *P. brasiliensis promatensis* ao longo do ano.

* Correspondência para: Guendalina Turcato Oliveira;

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Faculdade de Biociências

Departamento de Ciências Morfofisiológicas

Laboratório de Fisiologia da Conservação

Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco C, Sala 250

CP. 1429- Porto Alegre, RS 90619-900-Brasil

Fone: 55-51-33203545 (ramal 8324)

Fax 55-51-3320-3612

E-mail: guendato@pucls.br

Autores:

Guendalina Turcato Oliveira – Oliveira, G. T.

Coordenação, análises, elaboração e discussão.

Ludimila Carneiro Pinheiro – Pinheiro, L. C.

Coletas, análises, quantificações, elaboração e discussão.

Resumo: o objetivo deste trabalho foi analisar o *status* antioxidante através da análise sazonal das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione S-transferase (GST), além da medida da lipoperoxidação, através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em uma população de lagostins coletada em local de baixo impacto antrópico. Para isso coletamos um total de 69 indivíduos (37 machos e 32 fêmeas) de *Parastacus brasiliensis promatensis*, ao longo de um ciclo sazonal, dos quais utilizamos os tecidos branquial, muscular, hepatopancreático e gonadal (apenas de fêmeas) para as análises das medidas acima citadas, por espectrofotometria. Os níveis de TBARS se mostraram aumentados na primavera em quase todos os tecidos, para machos e fêmeas, coincidindo com o pico reprodutivo da espécie. A atividade da SOD apresentou-se constante ao longo do ano, com um declínio nos meses de verão para todos os tecidos, exceto para as brânquias de fêmeas. Já a atividade da CAT apresentou-se elevada no inverno e a da GST mostra um incremento no verão e no outono, seguido de uma intensa diminuição nos meses de inverno. Estes dados sugerem que tanto variações bióticas, como o ciclo reprodutivo, quanto variações abióticas, como os níveis de O₂ dissolvidos e pH, modulam o perfil do *status* antioxidante em *P. brasiliensis promatensis*, destacando-se que a demanda energética da reprodução conduz a um incremento da medida de dano oxidativo (TBARS).

Palavras-chave: *Parastacus*, dano oxidativo, enzimas antioxidantes.

Introdução

Segundo Ribeiro e Uieda (44) a comunidade de macroinvertebrados bentônicos constitui um grupo de organismos de água doce que colonizam tanto ambientes lênticos como lóticos os quais apresentam grande importância nesses ecossistemas servindo de elo entre os recursos basais (detritos e algas) e níveis tróficos superiores (peixes e outros). Estes invertebrados participam do fluxo de energia e da ciclagem dos nutrientes, bem como, realizam o biorrevolvimento da superfície do sedimento resultando na liberação destes nutrientes para a água e na aeração dos sedimentos (17).

Os macroinvertebrados bentônicos, grupo da qual fazem parte os crustáceos parastacídeos, constituem membros importantes da comunidade de rios, riachos e lagoas sendo o seu uso como bioindicadores na qualidade de águas igualmente recomendado, pois refletem as mudanças do ambiente (19). Considerando que dentre os crustáceos, os parastacídeos estão entre os lagostins que apresentam maiores adaptações a ambientes extremos como, por exemplo, fortes correntezas ou longos períodos de escassez de água ou déficit de oxigênio dissolvido (45), torna-se importante o aprofundamento do conhecimento da biologia dessa fauna constituindo-se assim, em um passo fundamental para o entendimento das relações interespecíficas e do ecossistema límnic como um todo.

Alguns autores (1) assumem a dificuldade de se obter resultados mais promissores em algumas linhas de pesquisa pela falta de um conhecimento prévio da espécie, tornando inviável o uso de biomarcadores ambientais, sem antes caracterizar a variabilidade natural destes modelos (29). Neste contexto, chama atenção à subespécie *Parastacus brasiliensis promatensis* uma vez que pode ser usada como espécie referência, pois é uma população restrita ao Riacho Garapiá, o qual se encontra dentro de um centro de preservação ambiental.

P. brasiliensis é um lagostim típico de ambiente límnico, abre tocas no substrato onde permanece por longos períodos de tempo, explorando o habitat principalmente à noite para forragear e possivelmente acasalar, apresentando como item principal de sua dieta os detritos de origem vegetal (11,16).

Crustáceos em geral apresentam uma alta demanda energética associada à reprodução, desde a formação dos gametas, maturação gonadal, principalmente nas fêmeas, pela síntese de vitelogenina, e nos machos pelos comportamentos de “busca ativa” da parceira, interações agonísticas e o acasalamento (47, 40, 42); além disto os indivíduos ficam expostos a uma série de alterações abióticas e bióticas ao longo do ano, entre elas podemos citar a temperatura, o fotoperíodo, a nutrição e padrões comportamentais (49, 31).

O estresse oxidativo pode ser definido como uma quebra do controle e sinalização redox, causado pelo desbalanço entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, em favor dos agentes pró-oxidantes (28). Os agentes pró-oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio, são um produto natural do sistema aeróbico tendo um papel como sinalizadores intracelulares e imunológicos entre outros; porém podem ter suas taxas de produção elevadas quando combinados com fatores patofisiológicos (50), como também com fatores ambientais (51). O malonaldeído (MDA) é um dos produtos finais da lipoperoxidação (53) que é um processo natural, pelo qual uma sequência de eventos desencadeados pelos radicais livres age sobre os lipídeos insaturados da membrana celular (24), sendo uma das funções, realizar a renovação destas membranas celulares. Quando ocorre o aumento das taxas deste processo, sendo um dos maiores fatores o estresse oxidativo, ocorre à destruição da estrutura da membrana celular e assim, a falência dos mecanismos de troca (6), podendo levar à morte celular.

Segundo Adiyodi e Adiyodi (2), a reprodução, assim como a ecdise, são eventos metabólicos que envolvem deslocamento de grande parte das reservas energéticas dos tecidos, principalmente o hepatopâncreas, para as gônadas e o eptélio, respectivamente.

Os agentes antioxidantes têm a capacidade de realizar mudanças necessárias para o organismo se adaptar aos pró-oxidantes. As três principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD) que decompõe o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a catalase que decompõe peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água, e a glutathione peroxidase (GPx) que reduz tanto peróxido de hidrogênio como hidroperóxidos lipídicos; constituindo assim, a primeira linha de defesa antioxidante dos organismos aeróbios, entre outras defesas enzimáticas e não enzimáticas (25). Já a GST degrada agentes alquilantes, como xenobióticos, participando na reação de biotransformação de xenobióticos na fase II de sua metabolização, catalizando a conjugação da glutathione com os produtos oxidados formados na fase I, permitindo assim sua excreção (46); esta enzima é um bom indicador de tolerância à poluição ambiental para muitas espécies, uma vez que promove proteção contra os efeitos deletérios de xenobióticos (30,14). As GSTs também desempenham vários papéis fisiológicos, tais como sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteróides, heme, bilirubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (21).

O objetivo deste estudo foi avaliar o *status* antioxidante, através da determinação, em diferentes tecidos, dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e da atividade das enzimas SOD, CAT e GST, ao longo de um ciclo sazonal, em machos e fêmeas, de espécimes de uma população de *P. brasiliensis promatensis*.

Material e métodos

Local e procedimento de coleta

Lagostins em estágio de intermuda foram capturados em um trecho do riacho Garapiá, no município de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil (29°29.371' S; 50°13.800' W), o qual se localiza dentro da área do Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza Pró-Mata, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Foram realizadas quatro campanhas amostrais, de outubro de 2013 a agosto de 2014, contemplando o mês central de cada uma das estações do ano a fim de se ter condições mais fiéis às características e particularidades de um ciclo sazonal.

Para a captura dos espécimes de *P. brasiliensis promatensis* foram utilizadas 80 armadilhas, que consistiam em garrafas pet de boca cônica invertida e como isca foi utilizado fígado de frango. As armadilhas eram colocadas ao entardecer e retiradas no outro dia no início da manhã. Os indivíduos capturados foram previamente medidos quanto ao comprimento do cefalotórax (CC), não sendo utilizados na pesquisa indivíduos com CC inferior a 2,5 cm, sendo este valor estipulado com base nas observações *in loco* em coletas preliminares, a fim de utilizar apenas indivíduos aptos a reprodução. No momento da coleta foram medidos na água do local de coleta: a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido, com o auxílio de um aparelho multiparâmetros (ASKO), e uma amostra de água foi recolhida para posterior análise do conteúdo de matéria orgânica no Laboratório de Análises e Processos Ambientais (LAPA) da PUCRS. Todos os animais foram coletados conforme a legislação brasileira (ICMBio- 43587) e o protocolo autorizado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (n° 13/00352).

Após, os indivíduos capturados, todos em período de intermuda, foram crioanestesiados e mantidos a menos -20°C nas dependências do Laboratório de Fisiologia da Conservação (PUCRS) para posterior dissecação, sexagem, pesagem e separação dos tecidos (brânquias, hepatopaneas, músculo abdominal e gônadas). As gônadas foram amostradas somente em fêmeas.

Preparo dos tecidos

Os tecidos foram homogeneizados e diluídos em 5 vezes o valor do seu peso em solução gelada de tampão fosfato (20 mM) contendo um inibidor de proteases, fenilmetilsulfonilfluoridre (PMSF), em uma concentração final de 1 mM. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 min à 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante (amostra) foi separado em alíquotas em tubos do tipo eppendorf para cada um dos procedimentos.

Dosagem de proteínas

As proteínas do sobrenadante da centrifugação foram quantificadas com uso do kit comercial da Labtest (Ref. 99), tendo como princípio a reação de íons cobre com as ligações peptídicas das proteínas séricas, em um meio de reação alcalino, formando um liquido de coloração púrpura que tem absorbância máxima em 545nm.

Medida de Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação foi quantificada, através do método de Buege e Aust (12) onde o material biótico a ser analisado é incubado em um meio de baixo pH, aquecido a temperaturas de 80°C a 100°C, na presença de Ácido Tiobarbitúrico (TBA). A condensação das substâncias reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) formam

produtos que podem ser mensurados através de absorção visível (532 nm) (32). As concentrações encontradas foram expressas em nmol de TBA/mg de proteínas.

Ensaio enzimáticos

As análises foram realizadas em triplicata nos quatro tecidos amostrados (brânquias, hepatopâncreas, músculo abdominal de machos e fêmeas e, gônadas apenas das fêmeas).

- *Superóxido dismutase:*

A técnica para determinação da SOD está baseada na inibição da reação do radical superóxido com a adrenalina. A oxidação da adrenalina leva à formação de um produto colorido, o adrenocromo, detectado espectrofotometricamente a 480nm; assim, uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (adrenalina). O meio de reação empregado consistiu de glicina-NaOH (50 mM, pH 10,5) e adrenalina (1 mM) (8). Para a determinação desta enzima foram obtidas curvas contendo 25 µl, 13 µl e 5 µl de amostra, sendo feita uma relação matemática da inclinação da curva destas concentrações com o tempo de leitura.

- *Catalase:*

Para determinar a atividade da enzima catalase foi feito previamente a ativação da enzima, a qual consistiu em misturar em 200 µl de amostra com 20 µl de etanol a 10%, agitando-se em vórtex, deixando em banho de gelo e após 30 minutos adicionou-se 20µl de triton X-100% a 10%. Após este processo, em 955 µl de tampão e 35 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, foi adicionado 10 µl de amostra ativada, sendo feito o monitoramento da diminuição da absorbância (diminuição do peróxido) no

comprimento de onda de 240 nm, por um período de tempo pré-determinado. Os resultados foram expressos em pmoles de H₂O₂ por mg de proteína⁻¹ por min⁻¹ (9).

- *Glutathione S-transferase:*

A atividade da glutathione S-transferase foi medida de acordo com o método descrito por Boyland e Chasseaud (10) pela medida da conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione reduzida (GSH) a atividade é medida com o aumento nos valores da absorbância lida a 340 nm. Para tal determinação foram utilizados 450 µl de mix contendo 1,05% de glutathione, 1,05% de CDNB e 98,9% de tampão, e 50 µl de amostra tecidual. Como agente iniciador da reação usou-se 50 µl da amostra e a atividade da enzima foi expressa como nmoles de conjugado CDNB. min⁻¹.mg proteínas⁻¹.

Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média ± erro padrão, analisados quanto à sua normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade através do teste de Levene. Quando os dados apresentaram uma distribuição normal foi feita uma Anova de uma via, seguida de Bonferroni quando $p > 0,05$ ou Games Howell quando $p < 0,05$ para o teste de Levene. Para a análise comparativa entre machos e fêmeas ao longo do ciclo sazonal foi utilizado ANOVA de duas vias. Parte das análises foram realizadas no SPSS, versão 20.0, e para dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com complementar de Dunn, sendo este teste feito através do programa BioEstatic versão 5.0. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

Resultados

Foi coletado um total de 69 animais, sendo 37 machos e 32 fêmeas, todos no período de intermuda, com o número de machos ou fêmeas variando de 5 a 15 por estação do ano.

Os dados abióticos apresentaram o menor valor de temperatura no inverno (13,4°C) e maior no verão (20,4°C). Já os valores de pH variaram durante as coletas atingindo valor mínimo no inverno de 6,55 e máximo na primavera de 9,12. Para o oxigênio dissolvido o maior valor foi registrado na primavera e o menor valor ocorreu no verão (10,66 mg/L e 3,31mg/L, respectivamente); como estes dados resultam de uma coleta pontual realizada em cada estação do ano não foi realizada uma análise estatística.

Brânquias

Os níveis de TBARS nas brânquias dos machos apresentaram-se elevados na primavera, sendo a diferença para as outras estações significativas apenas para o verão e o inverno (Tab. 1). Neste mesmo gênero, as brânquias apresentaram uma baixa atividade de SOD no verão quando comparado com outono e inverno. A CAT mostra um incremento no outono em relação à primavera e ao inverno. Para a atividade da GST houve um pico no verão quando comparada com os valores quantificados na primavera e no inverno. Para esta enzima ainda houve diferença significativa entre outono e inverno, sendo a atividade no outono superior a atividade do inverno (Fig.1).

Nas fêmeas os níveis de TBARS foram significativamente mais elevados na primavera em relação ao verão, sendo o verão significativamente menor em relação ao outono (Tab. 1). A SOD foi mais ativa no outono em relação ao verão; a CAT apresentou valores de atividade mais altos no inverno e mais baixos no verão; já a GST

foi mais elevada no verão em relação à primavera e o inverno, a análise estatística ainda mostrou uma maior atividade desta enzima no outono em relação ao inverno (Fig. 1).

Quando comparamos o perfil de resposta anual do *status* oxidativo entre machos e fêmeas, para o tecido branquial, observamos diferenças apenas na atividade da SOD.

Músculo abdominal

O nível de lipoperoxidação (TBARS) no músculo abdominal de machos foi significativamente maior na primavera, em relação ao verão e ao outono (Tab. 1). A atividade de SOD nos machos foi menor no verão, em relação à atividade observada no outono e no inverno. Já a atividade da CAT foi menor no verão em relação à primavera e ao inverno, e a GST teve sua menor atividade registrada no inverno, mantendo-se mais elevada e constante ao longo das demais estações do ano (Fig. 2).

A medida de lipoperoxidação no músculo abdominal de fêmeas foi maior na primavera, com níveis mais baixos obtidos no verão (Tab.1). A SOD para as fêmeas foi menor no verão e maior no outono e no inverno; a atividade da CAT foi menor no outono e maior no inverno e a GST teve sua atividade significativamente maior no outono em relação às demais estações do ano, sendo ainda a atividade do verão maior ($p < 0,05$) do que a atividade do inverno (Fig. 2).

Quando comparamos a resposta anual de machos e de fêmeas houve um perfil de resposta diferencial ($p < 0,05$) para a atividade das enzimas SOD e GST, além dos níveis de lipoperoxidação (TBARS) no músculo abdominal.

Hepatopâncreas

Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no tecido hepatopancreático de machos foi significativamente maior na primavera em relação ao

verão (Tab. 1). Para os machos, tanto a SOD quanto a CAT não apresentaram variações significativas ($p > 0,05$) ao longo do período amostrado, sendo observada uma tendência de diminuição ($p > 0,05$) da atividade da SOD na primavera; já a GST mostrou uma menor atividade ($p < 0,05$) no outono em relação às demais estações do ano (Fig. 3).

O TBARS nas fêmeas teve os mais baixos níveis de atividade no verão, sendo esta significativamente diferente dos níveis observados na primavera e no outono (Tab. 1). A SOD foi maior no outono em relação ao verão; a CAT não apresentou diferenças significativas e a GST teve maior atividade no verão, sendo significativamente diferente do outono (Fig. 3). Para o hepatopâncreas foi observado ainda uma diferença na atividade de SOD entre machos e fêmeas ao longo do ano.

Gônadas

A peroxidação lipídica (TBARS) em gônadas de fêmeas foi maior na primavera, sendo estatisticamente diferente apenas do verão (Tab. 1). As gônadas apresentaram um pico de atividade da SOD no verão, sendo estatisticamente superior aos valores encontrados no outono; já a CAT e a GST não apresentaram diferenças significativas ao longo do ano (Fig. 4).

Discussão

Em todos os tecidos analisados, tanto para machos quanto para fêmeas, foram verificados um incremento dos níveis de peroxidação lipídica na primavera. Este incremento coincide com o pico reprodutivo da espécie, o que sugere uma maior demanda energética para a maturação gonadal, comportamentos reprodutivos e tendência de alargamento da atividade exploratória do animal no ambiente; como já verificado em alguns estudos desenvolvidos com diferentes espécies de crustáceos

límnicos (40,13). Corroborando com esta afirmativa, foram observados na primavera níveis elevados de diferentes formas de lipídios circulantes (lipídios totais, triglicerídeos, colesterol total e VLDL) na hemolinfa, além dos menores valores do índice hepatossomático em fêmeas de *P. brasiliensis promatensis* no inverno e na primavera (43).

As gônadas apresentaram níveis de LPO menores que os verificados nos demais tecidos analisados neste trabalho, sugerindo uma mobilização mais pronunciada dos mecanismos de defesa antioxidante e assim, uma maior proteção deste tecido ao dano oxidativo e/ou um sistema de defesa antioxidante não enzimático mais robusto. Estudos futuros buscando entender o sistema de defesa não enzimático devem ser delineados. Porém, estes valores de lipoperoxidação mostraram um incremento na primavera (pico reprodutivo da espécie). Em mamíferos é sabido que as espécies reativas de oxigênio promovem ações fisiológicas e deletérias no trato reprodutivo. Estes radicais estão presentes nos ovários, na tuba uterina e nos embriões, estando envolvidos nos processos de maturação oocitária, esteroidogênese, e nas funções do corpo lúteo (3). Tal incremento da LPO foi acompanhado de uma tendência de aumento ($p>0,05$) da atividade da GST, a não significância pode estar relacionada à grande dispersão da atividade desta enzima observada, nestes animais, nesta estação (primavera); sendo assim, uma tentativa de minimizar os danos provocados pelo estresse oxidativo.

Neste mesmo tecido, a SOD apresentou seus maiores níveis no verão coincidindo com os menores valores de LPO e, a CAT apresenta uma tendência de aumento no inverno, contudo este não foi significativo em consequência, possivelmente da grande dispersão de atividade observada entre os animais coletados. Evidenciando assim um padrão sazonal de resposta do sistema antioxidante enzimático no tecido gonadal, sendo

este influenciado pelos eventos reprodutivos, como já observados em outros animais (34).

Para as fêmeas a lipoperoxidação foi sempre menor ou igual a dos machos em todas as estações do ano e em todos os tecidos estudados; contudo, nos meses de verão está se mostrou superior à dos machos no tecido hepatopancreático. Tal resposta coincide com uma baixa atividade da SOD e da CAT e, com níveis intermediários de atividade da GST, neste mesmo tecido. No período reprodutivo desta espécie (primavera-verão) há uma alocação das reservas energéticas dos tecidos principalmente, do hepatopâncreas para as gônadas, possivelmente para a síntese de vitelogenina e para sustentar o incremento do gasto energético com os comportamentos de cuidado parental (18). Ressaltamos que nesta estação (verão) observamos também uma redução nos níveis de oxigênio aliado a um pH ambiental mais elevado; juntos estes fatores parecem atuar como agentes estressores levando a um desequilíbrio no *status* oxidativo e assim, conduzindo a um aumento da lipoperoxidação (dano oxidativo) neste tecido.

Já para os machos a lipoperoxidação foi maior em todos os tecidos na primavera, coincidindo com o pico reprodutivo da espécie. Este padrão de resposta pode estar relacionado com o fato de os machos estarem explorando mais intensamente o meio ambiente a procura de parceiras reprodutivas e com isto aumentando as possibilidades de interações agonísticas. Entende-se por comportamento agonístico a disputa, muitas vezes corporal, por *status* hierárquico, com indivíduos da mesma espécie (37). O sucesso frente a uma disputa determina em longo prazo o *status* do indivíduo, sendo o vencedor de uma disputa o provável vencedor da próxima (5). Esta hipótese é reforçada com o trabalho de Oliveira (41) no qual foi constatado que em ratos, o comportamento agonístico causou o aumento dos valores de glutathione peroxidase, inferindo assim, como uma resposta ao incremento do *status* oxidativo. Em nosso estudo foi constatado

durante a primavera um claro perfil de aumento do dano oxidativo, aliado a uma insuficiência da atividade enzimática para combatê-lo. Este padrão é encontrado em diversas espécies animais (55, 4, 7, 39) devido ao alto gasto energético despendido para a reprodução.

Ao contrário do observado na primavera, os níveis de LPO em todos os tecidos estudados, em ambos os gêneros, foram menores no verão; tal fato pode ser explicado pela diminuição dos níveis de oxigênio dissolvidos na água e assim, um menor uso das vias oxidativas para a síntese de ATP o que levaria a uma menor formação de radicais livres. Segundo Martín (35) o principal sítio de formação de radicais livres é a fosforilação oxidativa. Segundo Dalosto e Santos (16) *P. brasiliensis* apresenta um metabolismo dependente da concentração de oxigênio, sendo mais pronunciado em níveis constantes de oxigênio ambiental.

O tecido branquial é considerado multifuncional em crustáceos, servindo de interface para o intercâmbio entre o meio interno e externo (20), onde ocorrem diversos processos que darão base para a respiração e a osmorregulação. É também o local onde vários metais tóxicos são armazenados, sendo um importante órgão a ser considerado na toxicologia das espécies (27). Em *P. brasiliensis promatensis* as brânquias, em ambos os sexos, apresentaram médias superiores de atividade da SOD quando comparadas aos demais tecidos estudados, sendo este mesmo padrão válido também para a CAT. É pertinente ressaltar ainda o aumento na atividade da GST nas brânquias de fêmeas durante o verão. Estes dados sugerem que exista uma tendência do tecido branquial quando comparado com os outros tecidos, de manter uma maior atividade das enzimas antioxidantes, principalmente a GST, além de estas atividades serem mais constantes ao longo do ano. Isso pode ocorrer, em parte, pelo fato deste tecido ter contato direto com o ambiente, havendo a necessidade de estar mais protegido contra as mudanças

ambientais (54). Porém, na primavera as enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST) não aumentam sua atividade, resultando em um aumento da lipoperoxidação.

Os valores de TBARS do músculo de machos na primavera foram os mais elevados, dentre os registrados, ao compararmos com os outros tecidos. Isto pode estar relacionado com o incremento da exploração ambiental, busca de parceira reprodutiva, e incidências de interações agonísticas, aliados a uma maior suscetibilidade deste tecido para enfrentar situações de alta demanda energética. Da mesma forma não houve qualquer indício de resposta enzimática a fim de neutralizar tal dano.

O hepatopâncreas em crustáceos tem diferentes funções, incluindo a digestão; a absorção; o armazenamento de nutrientes; a vitelogênese, durante o crescimento e desenvolvimento do ovário; a detoxificação de substâncias endo e xenobióticas; entre outras (56). Por outro lado atua de forma determinante no metabolismo de ecdiesteróides, esteróides que agem no processo de muda e reprodução, mantendo os níveis destes metabólitos regulados (38). Para *P. brasiliensis promatensis* o hepatopâncreas, apesar de sua importância como fonte de substrato energético no período reprodutivo, não apresentou níveis de atividade das enzimas estudadas superiores na primavera, com exceção da GST que apresenta uma tendência de aumento ($p > 0,05$) neste período, o que pode relacionar-se a síntese e regulação dos níveis de hormônios sexuais. Lembrando que a glutatona S-transferase participa das reações de biotransformação de endo e xenobióticos na fase II de sua metabolização e catalisa a conjugação da glutatona com produtos oxidados formados na fase I a fim de facilitar sua excreção (46), sendo assim podemos sugerir um maior grau de tolerância Do hepatopâncreas neste período do ano. Para a SOD observamos um aumento ($p < 0,05$) nos meses de outono e uma manutenção de sua atividade nas demais estações do ano, já a CAT mostra um incremento, não significativo, no inverno com sua atividade ficando

extremamente reduzida nas outras estações. Este padrão sequencial de ativação destas enzimas (outono e inverno) pode ser consequência da alta atividade e gasto energético determinado pela demanda reprodutiva nas estações anteriores.

A SOD constitui-se na primeira linha de defesa do sistema antioxidante enzimático, por agir diretamente na quebra do ânion superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio (57). Alguns estudos sugerem menor atividade das enzimas antioxidantes, incluindo a SOD, em temperaturas mais elevadas (48, 26); não havendo indícios de uma provável causa para este perfil. Estes dados estão de acordo com o perfil de atividade da SOD encontrado para o músculo abdominal e o hepatopâncreas de fêmeas e, as brânquias de machos e fêmeas, os quais mostraram menor atividade da enzima no verão, estação na qual foi registrada temperatura da água mais elevada. Podemos sugerir também, que em *P. brasiliensis promatensis* este perfil pode estar associado a menor exposição a agentes estressores; visto que esta estação corresponde ao final do período reprodutivo, onde poucos indivíduos ainda não reproduziram, e os que já reproduziram estão em fase de cuidado parental (22). Pelo fato da SOD ser a primeira enzima atuante em uma situação de estresse oxidativo, podemos inferir que o verão é a estação que apresenta menor necessidade de preparo e gasto com a ativação do sistema antioxidante.

Houve um padrão claro, em todos os tecidos das fêmeas de aumentarem significativamente a CAT no inverno. Este aumento pode estar relacionado com a menor temperatura, fato típico da estação, padrão já encontrado para *Carcinus estuarii* (36). Porém, em machos não observamos um padrão claro para esta enzima. Os valores estáveis de CAT para machos e altos para fêmeas, aliado aos dados de TBARS no músculo e nas brânquias maiores em machos, podem ser o indício de uma capacidade antioxidante mais limitada em machos. De forma geral podemos observar que picos de atividade da GST coincidem com menores valores registrados de CAT no mesmo

tecido; como também podemos constatar tal padrão em brânquias, músculo e hepatopâncreas. Tal perfil já foi descrito por Timofeyev e Steinberg (52), no qual os declínios de GST coincidem com aumentos de CAT. A não sobreposição destas duas enzimas pode estar relacionada a uma estratégia de manutenção energética, onde manter as duas ativas acarretaria em um alto custo energético; principalmente em situações como no inverno, onde Pinheiro e Oliveira (43) sugerem uma menor atividade dos animais, (menor taxa metabólica) aliada a baixos níveis glicêmicos.

Estes resultados comprovam a existência de estressores tanto no ciclo de vida como no ambiente natural indicando até o momento que este lagostim é capaz de se adaptar com sucesso a tais fatores. Contudo, cabe ressaltar que o habitat de estudo apresenta um baixíssimo grau de antropização. Em todo o mundo as principais ameaças à conservação e as principais causas de extinção de espécies nestes ecossistemas são poluição, manejo inadequado da terra, perdas de habitat, pesca e introdução de novas espécies (33) o que pode comprometer o sucesso adaptativo das espécies, incluso deste lagostim.

Os resultados indicam um claro padrão não só de sazonalidade como de personalidade tecidual quanto as variáveis oxidativas estudadas tal perfil permite que estes animais cumpram seu ciclo de vida e mantenham a homeostase. O perfil de resposta encontrado para o *status* oxidativo nos permite sugerir que agentes abióticos, como a temperatura e o oxigênio dissolvido, aliados a fatores bióticos, como a reprodução e atividade exploratória do habitat, estão entre os responsáveis direta ou indiretamente pelos resultados obtidos, uma vez que estes eventos biológicos que ocorrem com *P. brasiliensis promatensis* parecem ser fortemente modulados por tais condições; como já observado por Guerra *et al.* (23). Estudos futuros aprofundando o entendimento da variação sazonal destes fatores abióticos, como a realização de perfis de acompanhamento diários e sazonais, devem ser desenvolvidos a fim de elucidar o

ciclo de vida da espécie. Da mesma forma, mais estudos sobre a ecologia de *P. brasiliensis promatensis* se fazem necessários para uma compreensão mais ampla desta capacidade de adaptação, onde um maior entendimento sobre fatores como alimentação, por exemplo, podem ajudar a compreender os padrões aqui descritos.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa durante o período desta pesquisa.

Referências bibliográficas

1. Adams SM, McLean, RB. Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. J Fish Biol 26: C111-C126, 1985.
2. Adiyodi G, Adiyodi R. Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. Biol. Rev. 45: C121-C165, 1970.
3. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. Reprod Biol Endocrinol 3: C1-C21, 2005.
4. Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Devevey G, Prost J, Faivre B, Chastel O, Sorci G. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. Evolution 60: C1913-C1924, 2006.
5. Aquiloni L, Gonçalves V, Inghilesi AF, Gherardi F. Who's what? Prompt of social *status* in crayfish. Behav Ecol Sociobiol 66: C785-C790, 2012.
6. Benzie IFF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. Int J Food Sci Nutr 47: C233-C261, 1996.

7. Bize P, Devevey G, Monaghan P, Doligez B, Christe P. Fecundity and survival In relation to resistance to oxidative stress in a free-living bird. *Ecology* 89: C2584-C2593, 2008.
8. Boveris A, Cadenas E. IN: *Superoxide Dismutase* , Oberley, L. W. (ed.),v. II, c. 2, p. 15, 1982
9. Boveris A, Chance, B. The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: C707-C716, 1973.
10. Boyland E, Chasseaud LF. The role of glutathione and glutathione S transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32: C173-C219, 1969.
11. Buckup L. Família Parastacidae. In: Melo, G.A.S. *Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de Água Doce do Brasil*. C117- C141, 2003
12. Buege JA, Aust SD. The thiobarbituric acid assay. *Methods enzymol* 52: C306-C307, 1978.
13. Castiglioni DS, Oliveira GT, Bond-Buckup G. Dynamics of gonadal development of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Iheringia* 96: C413-C417, 2006.
14. Cogo AJ, Siqueira AF, Ramos AC, Cruz ZM, Silva AG. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Nat On Line* 7: C37-C42, 2009
15. Dalosto MM, Palaoro AV, Santos S. Mother-offspring relationship in the Neotropical burrowing crayfish *Parastacus pilimanus* (Von Martens, 1869) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 85: C1305-C1315, 2012.

16. Dalosto MM, Santos S. Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). *Compar Biochem Phys A* 160: C461–C466, 2011.
17. Devái G. Ecological background and importance of the change of chironomid fauna in shallow Lake Balaton. *Hidrobiologia* 191: C189-C198, 1990.
18. Dutra BK, Santos RB, Bueno AAP, Oliveira GT. Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyaella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Compar Biochem Phys A* 151: C322-C328, 2008.
19. Esteves FA. Fundamentos de Limnologia. Interciência. 2ª Ed., Rio De Janeiro, 602p, 1998.
20. Freire CA, Onken H, McNamara JC. A structure–function analysis of ion transport in crustacean gills and excretory organs. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 151: C272-C304, 2008.
21. Freitas DR, Vaz Junior IDS, Masuda. Expressão e atividade enzimática de glutathione s-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*; Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Rev bras parasitol Vet* 17: C99-C104, 2008.
22. Fontoura NF, Buckup L. Dinâmica populacional e reprodução em *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Rev Bras Biol*, 49: C911-C921, 1989.
23. Guerra C, Zenteno-Savín T, Maeda-Martínez AN, Philipp EER, Abele D. Changes in oxidative stress parameters in relation to age, growth and reproduction in the short-lived catarina scallop *Argopecten ventricosus* reared in

- its natural environment. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 162: C421-C430, 2012.
24. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57: C15-C25, 1993.
25. Halliwell B, Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th edn, Clarendon Press, Oxford. 2007
26. Hemmer-Brepson C, Replumaz L, Romestaing C, Voituron Y, Daufresne M. Non-stressful temperature effect on oxidative balance and life history traits in adult fish (*Oryzias latipes*). *J Exp Biol* 217: C274-C282, 2014.
27. Henry RP, Lucu Č, Onken H, Weihrauch D. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol* 3, 2012.
28. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: C1865-C1879, 2006
29. Koenig S, Solé M. Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Mar Environ Res* 79: C122-C131, 2012.
30. Kurelec B; Pivčević B. Evidence for a multixenobiotic resistance mechanism in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 19: C291-C301, 1991.
31. Leonard WR, Levy SB, Tarskaia LA, Klimova TM, Fedorova VI, Baltakhinova ME, Krivoschapkin VG, Snodgrass JJ. Seasonal variation in basal metabolic rates among the yakut (Sakha) of Northeastern Siberia. *Am J Hum Biol* 26: C437–C445, 2014.

32. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Farm Bioquim Univ Sao Paulo* C293-C303, 2001.
33. Maitland PS. The conservation of freshwater fish: past and present experience. *Biol Conserv* 72: C259-C270, 1995.
34. Malanga G, Perez A, Calvo J, Puntarulo S. The effect of seasonality on oxidative metabolism in the sea urchin *Loxechinus albus*. *Mar Bio* 156: C763-C770, 2009.
35. Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 34: C348-C357, 2002.
36. Matozzo V; Gallo C; Marin MG. Effects of temperature on cellular and biochemical parameters in the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *Mar Environ Res* 71: C351-C356, 2011.
37. Momohara Y, Kanai A, Nagayama T. Aminergic Control of Social *Status* in crayfish Agonistic Encounters. *PloS one* 8: C74489, 2013.
38. Mykles DL. Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *J Steroid Biochem Mol Biol* 127: C196-C203, 2011.
39. Nussey DH, Pemberton JM, Pilkington JG, Blount JD. Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Funct Ecol* 23: C809-C817, 2009.
40. Oliveira GT, Fernandes FA, Bond-Buckup G, Bueno AA, Silva RSM. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comp Biochem Physiol* 147: C600-C606, 2007.

41. Oliveira PM. Validação do modelo de estresse por instabilidade social em camundongos suíços. (Dissertação Mestrado). Florianópolis, SC, 2013.
42. Palaoro AV, Dalosto MM, Coutinho C, Santos S. Assessing the importance of burrows through behavioral observations of *Parastacus brasiliensis*, a Neotropical burrowing crayfish (Crustacea), in laboratory conditions. *Zool Stud* 52: C2-C9, 2013.
43. Pinheiro LC, Oliveira GT. Padrão metabólico de *Parastacus brasiliensis promatensis* ao longo do período reprodutivo. (Congresso Brasileiro sobre crustáceos). Porto Alegre, RS: Laboratório de Fisiologia da Conservação, 2014.
44. Ribeiro LO, Uieda VS. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos de um riacho de serra em Itatinga, São Paulo, Brasil. *Rev Bras Zool* 22: C613-C618, 2005.
45. Richardson AMM. The effect of the burrows of a crayfish on the respiration of the surrounding soil. *Soil Biol Biochem* 15: C239-C242, 1983.
46. Righetti BPH, Simões-Lopes PC, Uhart MM, Wilhelm Filho D. Relating diving behavior and antioxidant *status*: Insights from oxidative stress biomarkers in the blood of two distinct divers, *Mirounga leonina* and *Arctocephalus australis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 173: C1-C6, 2014.
47. Rosa R, Nunes ML. Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris*, and *Nephrops norvegicus* (Decapoda) from the portuguese outh coast. *Crustaceana*, 75: C1095-C1105, 2003.

48. Sakatani M, Balboula AZ, Yamanaka K, Takahashi M. Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycles and blood antioxidant levels in Japanese Black cow. *Anim Sci J* 83: C394-C402, 2012.
49. Seddon WL, Prosser CL. Seasonal variations in the temperature acclimation response of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Physiol Zool* C33-C44, 1997.
50. Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82: C291-C295, 1997.
51. Sroda S, Cossu-Leguile C. Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere*. 83: C538-C544, 2010.
52. Timofeyev MA, Steinberg CEW. Antioxidant response to natural organic matter (NOM) exposure in three Baikalean amphipod species from contrasting habitats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145: C197-C203, 2006.
53. Viarengo A, Canesi L, Pertica L, Poli G, Moore MN, Orunesu M. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Camp. Biochem. Physiol* 97: C37-C42, 1990.
54. Vinagre C, Madeira D, Mendonça V, Dias M, Roma J, Diniz MS. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. *Mar Environ Res* 97: C10-C14, 2014.
55. Wang Y, Salmon A B, Harshman LG. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. *Exp Gerontol* 36: C1349–C1359, 2001.

56. Wang W, Wu X, Liu Z, Zheng H, Cheng Y. Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PloS one* 9: C84921, 2014.

57. Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Ahmed A, Horn D, Kelly J M. Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med* 40(2): C198-C209, 2006.

Tabela 1: Níveis de peroxidação lipídica nos tecidos estudados de *P. brasiliensis promatensis* ao longo de um ciclo sazonal. Resultados expressos como a média ± erro padrão. Letras diferentes, em cada gênero, representam diferenças significativas para um $p < 0,05$. # representam uma resposta anual diferente entre machos e fêmeas.

Tecido		Brânquias	Músculo #	Hepatopâncreas	Gônadas
	Estação	Média± Erro Padrão	Média± Erro Padrão	Média± Erro Padrão	Média± Erro Padrão
Machos	Primavera	11,842 ± 1,959	15,315 ± 1,521	5,449 ± 0,859	-
	Verão	0,028 ± 0,004	0,017 ± 0,005	0,068 ± 0,012	-
	Outono	0,198 ± 0,081	0,033 ± 0,003	0,137 ± 0,012	-
	Inverno	0,083 ± 0,015	0,103 ± 0,025	0,253 ± 0,092	-
Fêmeas	Primavera	9,774 ± 3,595	6,120 ± 1,686	10,716 ± 5,379	2,723 ± 0,163
	Verão	0,040 ± 0,005	0,033 ± 0,010	0,046 ± 0,002	0,013 ± 0,003
	Outono	0,090 ± 0,008	0,049 ± 0,007	0,278 ± 0,037	0,025 ± 0,003
	Inverno	0,110 ± 0,046	0,044 ± 0,021	0,247 ± 0,046	0,030 ± 0,015

Fig. 1: Atividade das enzimas SOD, CAT e GST nas brânquias de *P. brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, sendo que barras pretas representam os machos, e brancas as fêmeas. Letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$, sendo maiúsculas para os machos e, minúsculas para as fêmeas. # representam uma resposta anual diferente entre machos e fêmeas.

Fig. 2: Atividade das enzimas SOD, CAT e GST no músculo abdominal de *P. brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, sendo que barras pretas representam os machos, e brancas as fêmeas. Letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$, sendo maiúsculas para os machos e, minúsculas para as fêmeas. # representam uma resposta anual diferente entre machos e fêmeas.

Fig. 3: Atividade das enzimas SOD, CAT e GST no hepatopâncreas de *P. brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão, sendo que barras pretas representam os machos, e brancas as fêmeas. Letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$, sendo maiúsculas para os machos e, minúsculas para as fêmeas. # representam uma resposta anual diferente entre machos e fêmeas.

Fig. 4: Atividade das enzimas SOD, CAT e GST nas gônadas de fêmeas de *P. brasiliensis promatensis*. As barras representam as médias \pm erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas para um $p < 0,05$.

Figura 1.

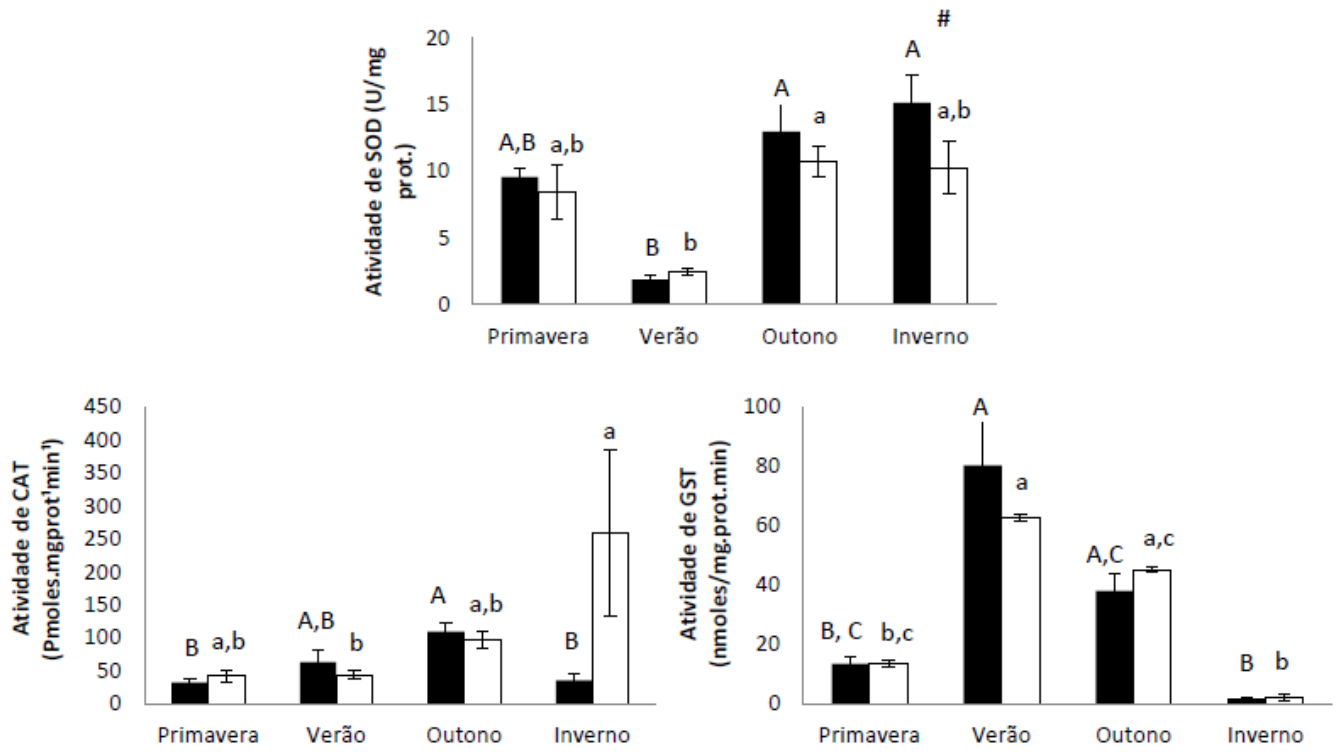


Figura 2.

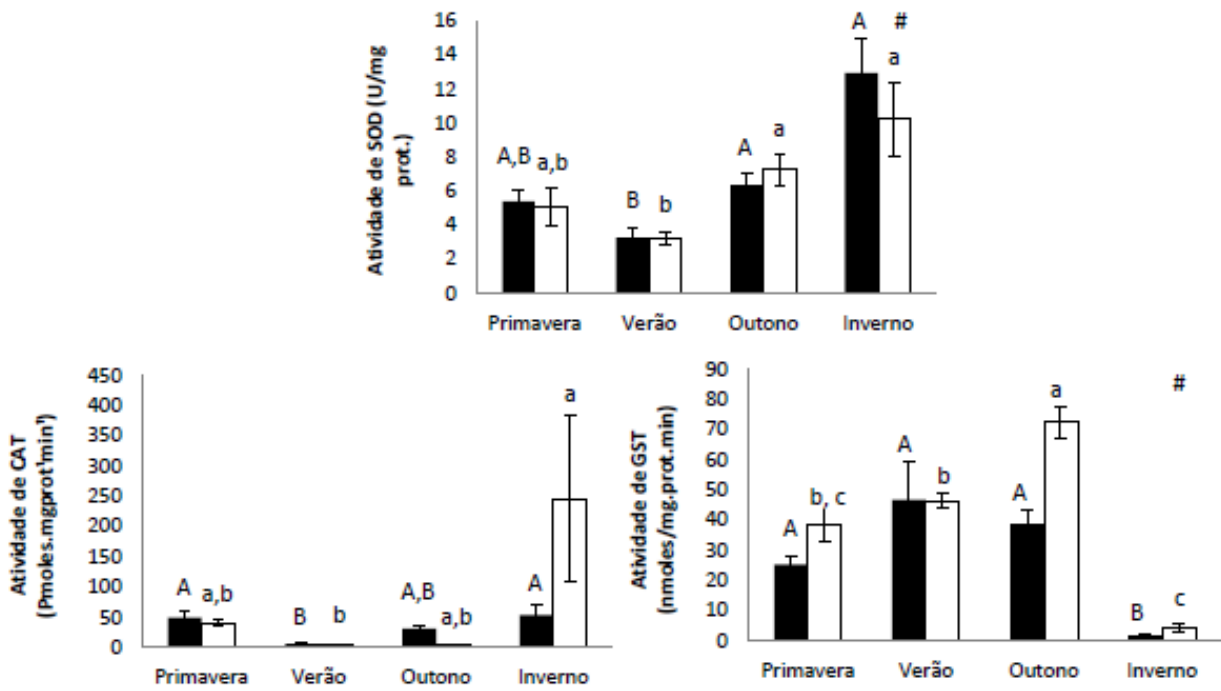


Figura 3.

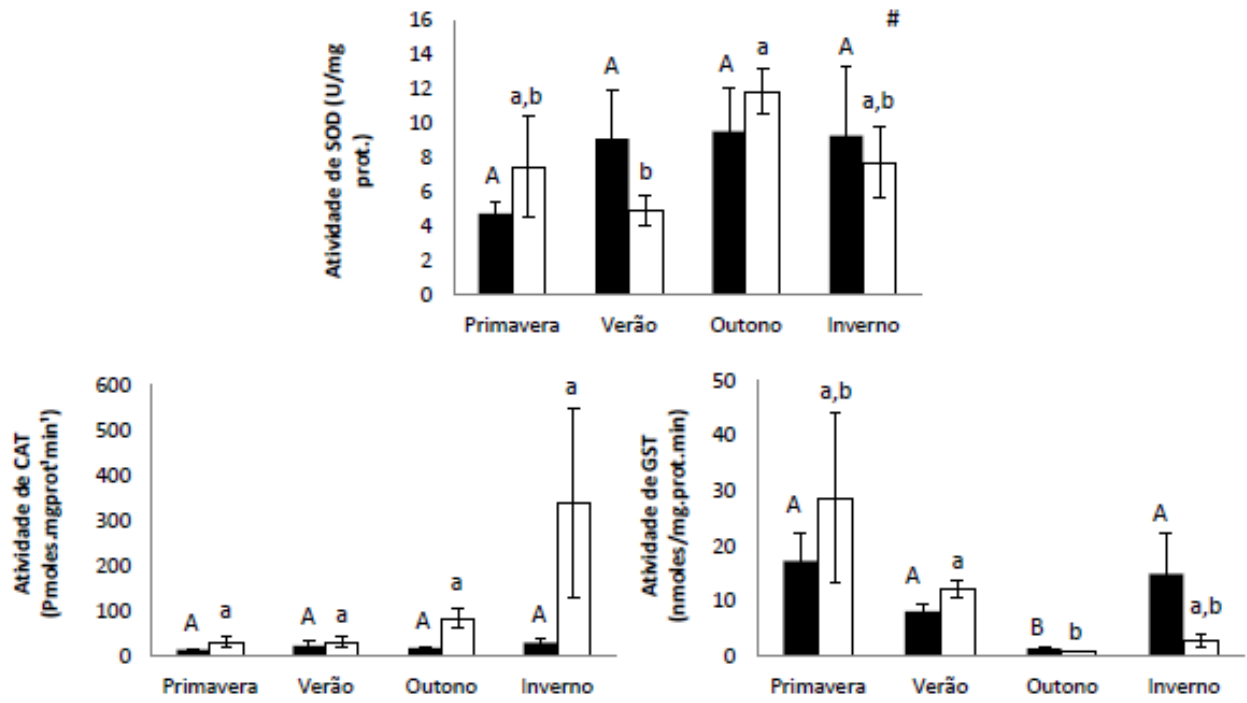
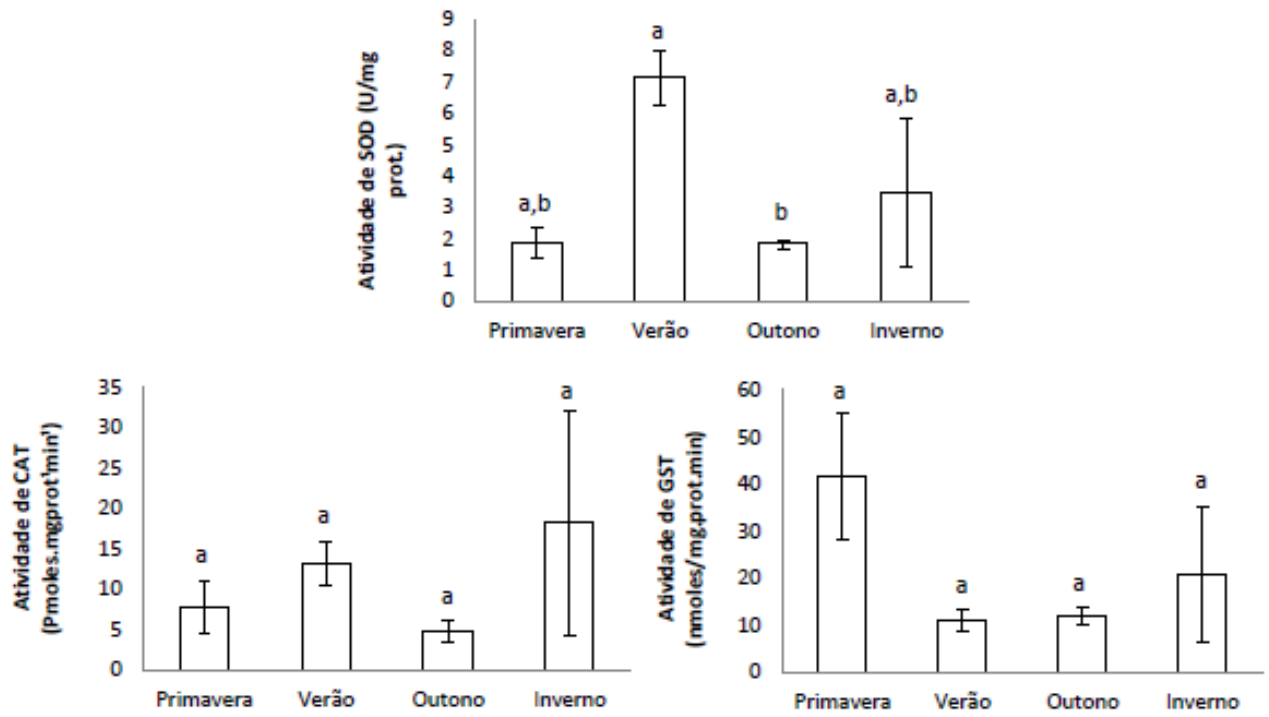


Figura 4



Conclusões gerais

Os resultados de ambos os artigos aqui apresentados demonstram de forma clara o efeito da sazonalidade e dos eventos de ciclos biológicos naturais como sendo moduladores dos padrões fisiológicos estudados nos indivíduos de *Parastacus brasiliensis promatensis*, tanto para machos quanto para fêmeas.

Como esperado, o ciclo reprodutivo mostra-se como um evento biológico significativo para alterações fisiológicas na espécie. Aumento nos níveis de todos os metabólitos da cadeia lipídica parece suprir a demanda energética destes animais para completar seu ciclo de vida anual; por outro lado, esta demanda não está aliada a um aumento da atividade das enzimas antioxidantes, principalmente no período reprodutivo, o que parece determinar um incremento considerável do nível de peroxidação lipídica em todos os tecidos.

O aumento de peroxidação lipídica e o incremento na demanda energética parecem não comprometer a sobrevivência de *P. brasiliensis promatensis*, uma vez que a população encontra-se estabelecida e foi observado durante o ano um abundante ingresso de juvenis.

Considerando que estes resultados contribuem significativamente para o entendimento do comportamento fisiológico do gênero *Parastacus* e até mesmo de outras espécies de crustáceos límnicos, temos que ressaltar que a inserção de algum fator estressante exógeno, como por exemplo, poluição e perda de habitat, possa alterar a dinâmica de vida deste animal podendo comprometer a manutenção de seu ciclo de vida e sua sobrevivência através de sobre incremento da demanda energética e consequente desbalanço oxidativo. Para confirmar tais inferências investigações sobre o comportamento do gênero *Parastacus* em ambientes com diferentes graus de antropização e modificação se fazem necessárias.

Normas de submissão

Revista Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology.

Submission. Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jeza-wiley>. Check for an existing account. If you are submitting for the first time, and you do not have an existing account, create a new account. Follow all instructions.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support at support@scholarone.com

Submit manuscript and all figures as separate files. You do not need to mail any paper copies of your manuscript.

The manuscript should have a uniform style and be submitted exactly as it is to appear in print. It should consist of the following subdivisions, each starting on a new page.

1. Title Page
2. Abstract
3. Text
4. Acknowledgments
5. Literature Cited
6. Footnotes
7. Tables

8. Figure legends

Cover Images.

Authors of manuscripts submitted to *JEZ* are encouraged to submit figures and corresponding descriptions for consideration as cover art of an issue. Every effort is made to use cover art related to an article within an issue, and thus authors are encouraged to submit images with the final manuscript submission. These images should be emailed directly to the Editor-in-Chief (crews@mail.utexas.edu), who will make the final decisions on cover illustrations.

Conflict of interest.

JEZ requires all authors to disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter (if applicable) to the Editor-in-Chief, in the manuscript (in the footnotes, Conflict of Interest or Acknowledgements section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Title page. The first page of the manuscript should include the following:

1. Complete title of paper
2. Author's name or names. We request that authors use full names in order to avoid errors caused by the use of initials. Each author's name should carry a superscript number. The corresponding author should be indicated by an asterisk.
3. Institutional affiliation(s) with city, state, and Zip code. Each distinct affiliation should be listed as a separate entity, with a superscript number that link it to the individual author(s).
4. Total number of text figures, graphs, and charts
5. Abbreviated title (running headline) not to exceed 48 letters and spaces
6. The correspondence address should appear as an asterisked footnote, worded as "Correspondence to:..." This should consist of the author's name and complete mailing address, even if identical to the one given above. The telephone and telefax numbers and the e-mail address should also be provided.
7. Supporting grant information should appear as a footnote on the title page and should include the grant sponsor and the grant number.

Abstract. An abstract of 250 words or less should be prepared. It will serve in lieu of a concluding summary and when published will precede the introductory section of the text. The abstract should be written in complete sentences and should succinctly state the objectives, the experimental design of the paper, the principal observations and conclusions, and be intelligible without reference to the rest of the paper. Abbreviations should be used sparingly in the abstract and must be spelled out completely the first time they are used. References to the literature should not be cited in the abstract without the complete citation.

Literature cited. Each reference in the text must appear in the literature list, and each reference in the literature list must be cited in the text. References in the text to the literature should be cited by author's name followed by year of publication:

. . . studies by Tucker ('91) reveal . . .
. . . studies by Desvages and Pieau ('91) reveal . . .
. . . studies by Hara et al. ('92) reveal . . .
. . . an earlier report (Tucker, '91) . . .
. . . earlier reports (Desvages and Pieau, '91; Hara et al., '92) . . .

References should be listed in chronological order. Beginning with 1901, and thereafter, references in the text to the literature are made by an abbreviated date of publication after author's name: ('01), ('04), ('94) not (1901), (1904), (1994). Reference in the text to papers published before 1901 or after 1999 should not be abbreviated: (1784), (1889), (1900); (2004).

When more than one is cited:..."earlier reports (Bunt et al, '80; Briggs and Porter, '85, Laemle, '90) suggested that..."When references are made to more than one paper by the same author, published in the same year, they are to be designated in the text as (Tucker, '91a,b) and in the literature list as follows:

Tucker RP. 1991a. The sequential expression of tenascin mRNA in epithelium and mesenchyme during feather morphogenesis. Roux's Arch Dev Biol 200:108-112.

Tucker RP. 1991b. The distribution of tenascin and its transcript in the developing avian central nervous system. J Exp Zool 259:78-91.

Literature Cited is to be arranged alphabetically by authors in the following style:

Author's name (or names), year of publication, complete title, volume and inclusive pages, as follows:

Desvages G and Pieau C. 1991. Steroid metabolism in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of eggs. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39:203-213.

Hara K, Fujiwara S, Kawamura K. 1992. Retinoic acid can induce a secondary axis in developing buds of colonial ascidian, *Polyandrocarpa misakiensis*. *Dev Growth Differ* 34:437-445.

Larsen RJ, Marx ML. 1990. *Statistics*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Pörtner HO, Grieshaber MK. 1993. Critical P_{O_2} (s) in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: Eduardo J, Bicudo PW, editors. *The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life*. Boca Raton, FL: CRC Press. p 330-357.

Tucker RP. 1991a. The sequential expression of tenascin mRNA in epithelium and mesenchyme during feather morphogenesis. *Roux's Arch Dev Biol*, 200:108-112.

Tucker RP. 1991b. The distribution of tenascin and its transcript in the developing avian

central nervous system. *J Exp Zool* 259:78-91.

Vetter RD, Powell MA, Somero GN. 1991. Metazoan adaptations to hydrogen sulphide. In: Bryant C, editor. *Metazoan Life Without Oxygen*. London: Chapman and Hall. p 109-128.

Abbreviations of journal titles should follow those used in *Index Medicus*; never abbreviate the year in the list of Literature Cited.

A paper that is "In Preparation" or "Submitted" is not considered a legitimate reference and will not be included in the Literature Cited section. (Such work can be cited in the text as a Personal Communication.)

Footnotes. Number footnotes to the text consecutively with corresponding reference numbers clearly indicated in the text. Additional references to the identical footnotes are to be numbered with the next following consecutive number; for example:

² Material used for this experiment secured through the courtesy of . . .

³ See footnote 1, page . . .

Footnotes to a table should be typed directly beneath the table and lettered 1,2,3 etc. They should not be numbered in sequence with the footnotes in the text. Asterisks are used for *P* values.

Tables. All tables must be numbered and cited consecutively in the text, and they should have titles that are complete but brief. Since tabular matter is expensive to reproduce it should be simple and uncomplicated, with as few vertical and horizontal rules as possible and no vertical rules. The text should indicate where the tables are to

appear in the text. Tables should be numbered with arabic, not Roman, numerals. Information other than that defining the data should be presented as table footnotes.

Legends. All figures (including charts and graphs) must be numbered and cited consecutively in the text. Figure legends are to be numbered consecutively, as follows:

Fig. 1 ...

Fig. 2 ...

Reference to relevant text passages can often reduce the length of legends and avoid redundancy. Figures may extend across two or more pages, but each figure requires a separate legend, except for a plate of figures that can be described in a single legend.

Abbreviations. Abbreviations pertaining to the labeling of figures should be listed once alphabetically and placed before the first figure containing these abbreviations:

General Manuscript Instructions. The manuscript should be double-spaced throughout with a 1" (2.5 cm) margin on all sides. Submitters can indicate preference of division for the review and publication of their work.

Number all pages of the manuscript consecutively.

Do not divide words at the end of a line, for if they are unfamiliar to the printer they may be incorrectly hyphenated. Manuscripts should not be right-hand justified.

Do not begin sentences with abbreviations or Arabic numerals -- always spell out numbers when they stand as the first word in a sentence; do not follow such numbers

with abbreviations. Use Arabic numerals to indicate time, weight, and measurements when followed by abbreviations (e.g., 2 mm; 1 sec; 3 ml). Numbers applicable to the same category should be treated alike throughout a paragraph (e.g., 2 male rates and 4 female rates). In general, the numbers one to ten should be written in the text; all numbers over ten should be given in Arabic numerals (12, 27, 42, etc.).

The word "Figure" is not abbreviated in the text except when appearing in parentheses: Figure 2 (Figs. 4-6).

Spell nontechnical terms according to the current Webster's International Dictionary.

Dates should be written as follows:

October 11, 1994 –or– 11th of October

Label any Greek letters in your manuscript which could be confused with English alphabet characters. For example, μ is easily confused with u.

The sections on Materials and Methods should include a clear description of the method of killing of any animals that may be used. Research involving vertebrate animals must have been approved by the author's institution's animal care and use committee and should conform to NIH guidelines. A statement to this effect must be included in the Materials and Methods section.

The manuscript should be accompanied by a statement by the submitting author certifying that all the authors have read the paper and have agreed to having their names listed as authors. A similar statement should be appended for the names of colleagues who are acknowledged in footnotes as having contributed to or criticized the paper.

Either American or British spelling is acceptable so long as one usage is maintained throughout the paper.

Supplementary Material. Authors are encouraged to submit supplementary material that could aid readers in understanding the authors' findings and where appropriate to ensure that the page limits are met. Supplementary material for articles published in the *Journal of Experimental Zoology Part A* will be available in the online version of the journal. This accompanying information may include (but is not limited to) figures, tables, video clips, large sections of movies (QuickTime or mpeg), data sets, program code, and electronic graphical files. Supplementary material must be submitted at the time of peer review, although the reviewers and editors may also suggest that figures or table(s) be provided as supplementary material during the review process. Each piece of supplementary material should be referenced within the text, and files should be no larger than 50 MB. Supplementary material should be numbered in order, but independently of figures in the main article, e.g. S- Figure 1 would indicate a figure that follows Figure 1 in the main text. Please note that supplementary material is NOT edited by the publisher after final acceptance by the editors, and is posted online in the format in which it is supplied.

Measurements. Express all measurements (weight, etc.) according to the metric system. Metric abbreviations, as listed below, should be lowercase without periods. Temperatures should always be expressed in degrees Celsius (centigrade).

Symbols. When preceded by a digit, the following symbols are used:
% for percent ° for degree (temperature).

Illustrations

General Instructions. Figures must be submitted as TIF or EPS files; Word, JPG, and GIF files are not acceptable.

Resolution. Journal quality reproduction will require greyscale and color files at resolutions yielding approximately 300 ppi. Bitmapped line art should be submitted at resolutions yielding 600-1200 ppi. These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

File names. Illustration files should be given the 2- or 3-letter extension that identifies the file format used (i.e., .tif, .eps).

Color illustrations. Authors are encouraged to submit color illustrations. Color reproduction is free for the first page, and \$500 for each subsequent page. Once a paper has been accepted, the author will have the opportunity to approve costs and proofs prior to printing.

Lettering and labels. Consideration must be given to achieving greatest contrast between the label or letter and its background, placing white labeling over dark backgrounds and black labeling over light backgrounds.

Numbering. Figures, including charts and graphs, are to be numbered consecutively. Plates of photomicrographs are preferably labeled as a single figure with panels labeled as A,B,C,D, etc. (lower or uppercase).

Services for Non-native Speakers

The *Journal of Experimental Zoology* offers a service for contributors whose native language is not English. Contributors who are not at ease with the English language

sometimes find it difficult to prepare acceptable manuscripts. Our service called *Revise* is intended to help authors in such instances. *Revise* works in the following way. Authors wishing to avail themselves of this service will so indicate when they submit manuscripts. A *Revise* manuscript accepted for publication on scientific merit will then be judged on the basis of its English grammar and composition. If a manuscript requires *Revise* editing, the manuscript will be sent to a professional English language editor. Type should be double-spaced and no less than 14 points in size. Corrected manuscripts will be returned to authors to assure that revisions have not altered the original scientific intent of the manuscript.

We believe this service is advantageous in a number of ways. Namely, it helps authors to prepare superior text, it frees the reviewers from this task so they can confine themselves to a consideration of the scientific content of manuscripts, and finally it shortens the publication time of articles requiring grammatical revision.

Copyright/Licensing.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement:

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA

can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:
CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

Page Charges. It is the policy of the Journal not to levy page charges.

Proofs. A single set of page proofs will be sent to the author. All corrections should be marked clearly directly on page proofs.

Reprints. Reprints may be purchased at the following address:
<https://caesar.sheridan.com/reprints/redir.php?pub=10089&acro=JEZ>

Rapid Communications for Short Reports of Timely and Unusual Interest

Publication within approximately eight weeks of receipt by the Publisher will be provided for manuscripts of timely and unusual interest. These should consist of approximately eight to ten typewritten pages and one page of illustrations. Authors will receive proofs, which should be returned promptly in order to effect quick publication.

Revista American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology

Title Page

All submissions must contain a title page however brief the article may be (including, but not limited to, brief items such as editorials). The title page must contain the full title of the article; author(s) name(s); all departments and institutions in which the work was done; an abbreviated title for the running head; and the corresponding

author's name, e-mail, and physical address for correspondence. Only one author may be designated as the corresponding author.

Title

Make the title succinct and informative. Avoid unnecessary words like "Studies in....". The title must not exceed 160 characters, including spaces between words.

Authors

List all authors' names and their first names or initials exactly as they should be known. Do not include any specific titles (e.g., PhD, MD, and Prof. are not needed). Include a brief itemized list of how each author contributed to the study.

"Group authorship" is allowed, with the name of a group (such as a consortium or program) to be listed as an author, with members of the group listed in the Acknowledgements section; however, the Program Director of the named group must be the one who signs for the group when the group's "author" signature is needed, i.e., on a Mandatory Submission Form or a Change of Authorship Form.

Authors who publish in APS journals may now present their names in non-Latin characters (in their native writing system) along side the standard English transliteration of their name in the main author line of the published article; for example, "Ta-Ming Wang (王大明)". We will accept any non-Latin languages that have standard Unicode characters designated for the native characters. For authors that choose this option, please only provide the native expression for the original written form of the transliterated name; that is, do not include any associated degree, rank, or title information in the native format. This feature is meant for the person's name only, not for ancillary information regarding academic achievement or institutional affiliation. To take advantage of this new feature, please insert the native expression of your name

along side the English transliteration in the main title page of your manuscript submission.

The APS Journals program is now participating in the ORCID Registry. Authors submitting manuscripts to APS journals will now have the option to attach their ORCID identifier to their author profile in the APS Manuscript Submission system, or register for one if they are a new participant. This ORCID identifier will be included in the article metadata, if published, which may facilitate broad-reaching linkages of many pieces of an author's work across multiple databases (such Pubmed, PMC, and others).

ORCID is "an open, non-profit, community-based effort to create a permanent registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers."

Please see the ORCID website for more information and to register for an ORCID identifier.

Affiliation

List all departments and institutions in which the work was done, with city and state or country. Identify each author's affiliation by superscript numbers matched to the appropriate institution. Affiliation must reflect the organization(s) supporting the author(s) while the research was done. This may differ from the current affiliations of the author(s), which will be listed in such cases in the Acknowledgments section as the present address(es) of the author(s).

Running Head

The running head is an abbreviated version of the title, which will appear at the top of every page subsequent to the first page. Running heads must not exceed 60 characters including spaces between words.

Address for Correspondence

Only one author may be designated as the corresponding author. A full address for correspondence must be included, with a current, valid e-mail address for the corresponding author. The address of the corresponding author will appear on the first page of the article. Please note that a valid e-mail address is essential to participate in the APS electronic proofing service. Also, provide your phone and fax numbers for use while your article is in production. If the contact information to be used during production differs from that to be included in the final article, indicate this explicitly.

Abstract

A one-paragraph abstract of not more than 250 words must accompany each manuscript. Longer abstracts may be subject to editorial truncation, to conform to the conventional perceptions of brevity that characterize an "abstract". The abstract should state what was done and why (including species and state of anesthesia), what was found (in terms of data, if space allows), and what was concluded. Even for short editorial-style articles, a brief "abstract" should be provided, if only to identify the topic (e.g., "This is an editorial summarizing recent new developments in physiology.").

Keywords

Include three to five words or short phrases relevant to the article.

Glossary

A glossary may be included (and is often helpful) in equation-laden articles with many different symbols (such as mathematical modeling or computational papers),

specifying the units (and/or dimensions) as well as each definition. The glossary will usually precede the Methods section. See this article for an example.

Introduction

Provide a brief overview of the scope and relevance of the study, especially with regard to previous advancements in related fields.

Materials and Methods

Describe techniques, cell/animal models used (including species, strain, and sex), and lists of reagents, chemicals, and equipment, as well as the names of manufacturers and suppliers, including URLs for those supplies obtained online, so that your study can be most easily replicated by others. For studies involving humans, the sex and/or gender of participants must be reported. Also in this section, describe the statistical methods that were used to evaluate the data. If clinical trials were used, a statement of registration is required; also, for all investigations involving humans or animals, a statement of protocol approval from an IRB or IACUC, or an equivalent statement, must be included (see Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings). All animal or human studies must contain an explicit statement that the protocols were submitted to, and approved by, an institutional review board or committee or that the protocols were performed under a license obtained from such a committee, board, or governing office.

Results

Provide the experimental data and results as well as the particular statistical significance of the data.

APS has published an editorial on the use of statistics, and authors are encouraged to consult it.

Discussion

Sometimes combined with the results in a section called "Results and Discussion". Explain your interpretation of the data, especially compared with previously published material cited in the References.

Appendix

An Appendix may be included (and is often helpful) in mathematical modeling or computational papers, e.g., to provide details of a solution strategy.

Acknowledgements

The acknowledgements section is where you may wish to thank people indirectly involved with the research (e.g., technical assistance; gifts of samples, reagents, or cell lines; loans of equipment or laboratory space; comments or suggestions during the creation of the manuscript). However, it is important that anyone listed here know in advance of your acknowledgement of their contribution, as documented during the submission process.

Current addresses of authors (which may differ from those in the affiliation line) may be included here.

Do not include "promissory notes." APS Journal policy is against inclusion of implicit or explicit promises that future work will be published.

Do not include dedications (e.g., to persons living or deceased). Dedications of articles are not permitted.

Grants

List the grants, fellowships, and donations that funded (partially or completely) the research. However, industry-sponsored grants should be listed under Disclosures.

Disclosures

Authors of research articles are required at the time of submission to disclose to the APS Publications Office any potential conflict of interest, financial or otherwise. See Conflicts of Interest. If the article is accepted for publication, information on the potential conflict of interest, or lack thereof, must be noted in the Disclosures section.

Footnotes

The footnotes section is the place to list any additional items pertinent to your article, including but not limited to links to non-peer-reviewed data that may be available to readers from your institutional web site.

Footnotes should be numbered consecutively throughout. They should be assembled on a separate page at the end of the article.

References

Authors are responsible for accuracy of citations. References must be limited to directly pertinent published works or papers that have been accepted for publication. An abstract, properly identified as "Abstract", may be cited only when it is the sole source.

Reference lists should be arranged alphabetically by author and numbered serially. The reference number should be placed in parentheses at the appropriate place in the text.

The style of citation should be as follows, with journal name abbreviated as in Medline, PubMed, and Index Medicus. Appropriate templates for your citation management software are available from the respective company websites (e.g., EndNote, Reference Manager).

The examples given below are shown with numbers because that is the style for most APS Journals, except for the Journal of Neurophysiology (see note, below, after these examples). The first is a standard journal reference; the second is a standard book

reference; and the third a standard reference to an "early view" or "prepress" reference, such as the APS "Articles in PresS" (note the use of the "digital object identifier"—doi—in this citation).

1. Pollock DM. Endothelin receptor subtypes and tissue distribution. In: Endothelin Molecular Biology, Physiology, and Pathology, edited by Highsmith RF. Totowa, NJ: Humana, 1998.

2. Scarafia LE, Winter A, Swinney DC. Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. *Physiol Genomics* (April 26, 2001). doi:10.1152/physiolgenomics.00075.2001.

3. Villalobos AR, Parmelee JT, Renfro JL. Choline uptake across the ventricular membrane of neonate rat choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol* 276: C1288-C1296, 1999.

Submitted papers still in preparation or in peer review and/or any other unpublished materials, observations, or personal communications cannot be included in the reference list, which may only list published work. However, such material can be cited in the text, but at submission, authors will be required to confirm that all individuals acknowledged in the manuscript are aware that they are being acknowledged and approve of the manner and the context of the acknowledgement. This includes, but is not limited to the following circumstances:

To publish information disclosed in a personal communication or unpublished observation;

To recognize additional individuals who helped in preparation of the manuscript;

For permission from a copyright holder to discuss information that has been accepted for publication but is "in press" and not yet available, online or otherwise.

For both unpublished observations and personal communications, provide the cited person's last name and all initials.

Figure Captions

Every figure must have a descriptive figure caption, to describe to the reader in sentence form the relevant details of the figure, to place it in the proper context of the manuscript. These textual figure captions must be listed in order in the manuscript, following the reference list.

Tables

Whenever possible, authors are encouraged to submit figures rather than tables. Statistical summary tables should be submitted when possible, rather than tables with many lines of individual values. Lengthy tables of data that cannot be presented in a suitable manner, according to APS standards of print publication, may be extracted and set as a supplement to the online article. These supplements remain an integral part of the article for the reader, as text referring to these tables will remain in the article, and links directly to the supplements will be embedded and prominently indicated at all points of entry to the online article (see Data Supplements).

Submitted tables should adhere to the following guidelines:

Tables must not duplicate material in text or figures.

Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and prepared with the size of the journal page in mind: 3.5 in. wide, single column; 7 in. wide, double column.

Each table should have a brief title; explanatory notes should be in the legend, not in the title.

Nonsignificant decimal places in tabular data should be omitted.

Short or abbreviated column heads should be used and explained if necessary in the legend.

Statistical measures of variations, SD, SE, etc., must be identified. (Example: "Values are means \pm SE.")

Table footnotes should be listed in order of their appearance and identified by standard symbols: *, †, ‡, § for four or fewer; for five or more, consecutive superscript lowercase letters should be used (e.g., a, b, c, etc.).