

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**ESTUDO SAZONAL DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO E DO BALANÇO
OXIDATIVO DE *Hyalella kaingang* (CRUSTACEA, HYALELLIDAE) EM
AMBIENTE NATURAL**

Fernando Machado Braghirolli

**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
2015**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA**

**ESTUDO SAZONAL DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO E DO BALANÇO
OXIDATIVO DE *Hyalella kaingang* (CRUSTACEA, HYALELLIDAE) EM
AMBIENTE NATURAL**

Fernando Machado Braghirolli

Orientador(a): Dra. Guendalina Turcato Oliveira

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS - BRASIL

2015

SUMÁRIO

Agradecimentos	4
Resumo	6
Abstract	7
Apresentação	8
Introdução Geral	9
CAPITULO I: ESTUDO SAZONAL DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO E DO BALANÇO OXIDATIVO DE <i>Hyalella kaingang</i> (CRUSTACEA, DOGIELINOTIDAE) EM AMBIENTE NATURAL	15
1. Introdução	17
2. Materiais e métodos	18
3. Resultados	23
4. Discussão	26
5. Conclusão.....	33
6. Agradecimentos	34
Referências.....	34
Referências da Dissertação	43
NORMAS PARA PUBLICAÇÃO	50

Agradecimentos

If I have seen further than others, it is by standing upon the shoulders of giants.

-Sir Isaac Newton

Primeiramente, gostaria de agradecer minha família – especialmente meus pais, Eduardo e Eunice, e minha avó, Adelir - por todo o carinho, atenção e incentivo durante a minha caminhada acadêmica;

À minha namorada, companheira de campo e de laboratório, Maiara, por me apoiar, me estimular, me ouvir reclamar e me ajudar a superar as barreiras que por vezes julguei serem intransponíveis durante o desenvolvimento desse trabalho;

Ao grupo do laboratório de Fisiologia da Conservação, por todas as conversas em reuniões, experimentos ou trabalhos de campo que de alguma forma contribuíram com informações científicas e ideias. Em especial aos amigos Ludimila, Fabiano e Betânia, por todos os momentos de aula, discussões sobre os projetos, auxílios nos experimentos e procedimentos de campo no Pró-Mata;

À Prof. Guendalina, que me acolheu desde a graduação no grupo do laboratório, e sempre exigiu que déssemos o melhor de nós para o desenvolvimento de nossos trabalhos;

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Zoologia, por todo o conhecimento que me foi dado enquanto aluno;

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de pesquisa durante todo o período do mestrado;

A todos os meus amigos, pelos momentos de alegria e diversão durante os períodos de maior tensão do desenvolvimento deste trabalho.

“The movement you need is on your shoulder” – Lennon/McCartney

“There are surely problems in the universe so advanced that our human brain cannot see them as problems in need of solution.” –Neil deGrasse Tyson”

Resumo

Atualmente, a realização de levantamentos biológicos que sejam capazes de classificar e caracterizar a biodiversidade e suas relações ecológicas tem sido cada vez mais importante e necessária na busca da conservação ambiental. A fisiologia da conservação preocupa-se em estudar e qualificar diversas variáveis relacionadas a um organismo, para que assim seja possível ampliar os conhecimentos acerca do funcionamento de determinada espécie e detalhar necessidades básicas ambientais ou estabelecer períodos de vulnerabilidade natural. O gênero *Hyaella*, de distribuição americana, tem uma grande importância nas cadeias tróficas onde ocorrem, tornando-se uma ligação fundamental em processos de transferência energética. O anfípodo *Hyaella kaingang*, uma espécie recentemente descrita e pouco estudada, foi utilizada nas pesquisas referentes às análises sazonais, e o objetivo do presente trabalho foi analisar o funcionamento metabólico, a alocação energética, os níveis de lipoperoxidação e atividades de enzimas antioxidantes da espécie. Foram utilizados 30 animais de cada sexo em cada estação do ano, os quais foram coletados dentro do Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza (CPCN) Pró-Mata, no município de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul. Em campo, os animais foram eutanaziados por crióanestesia e no laboratório, homogeneizados para a quantificação dos níveis de proteínas, glicogênio, lipídios, triglicerídeos, glicerol, lipoperoxidação e a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutatona S-transferase. Houve diferença significativa nos níveis de glicogênio, lipídios, triglicerídeos, lipoperoxidação e na atividade das enzimas superóxido dismutase e glutatona S-transferase ao longo de um ciclo sazonal, tanto em machos como em fêmeas. Os resultados encontrados a partir dos biomarcadores de metabolismo energético e do estresse oxidativo indicam tendências alimentares direcionadas ao consumo predominantemente de proteínas, e também que o período reprodutivo da espécie seja longo, hipótese baseada também na observação de fêmeas ovígeras em muitas estações. Sugere-se também, que exista um pico de atividade reprodutiva no outono. Contudo, mais estudos devem ser realizados com a espécie para que possam ser aprofundados os conhecimentos acerca da biologia reprodutiva, ecologia geral e fisiologia desta espécie. O presente trabalho reforça a ideia de que deve haver uma maior integração entre diferentes campos científicos para que se possa obter um perfil mais preciso de um determinado organismo.

Palavras-chave: fisiologia da conservação, crustácea, anfípodo, variação sazonal, metabolismo energético, estresse oxidativo.

Abstract

Currently, the execution of biological research that is able to classify and characterize the biodiversity and its ecological relations has been increasingly important and necessary in order to achieve environmental conservation. Conservation physiology is concerned about studying and qualifying many variables related to an organism, so that is possible to increase the knowledge about the functioning of a given species and to detail main environmental requirements or to establish periods of natural vulnerability. The genus *Hyalella* presents an American distribution and has a great importance on the food chain where it occurs, and becoming a fundamental link in processes of energy transference. The amphipod *Hyalella kaingang*, a very recent described species and so far not very studied, was used on this study of seasonal variation, and the objective of the present work was to analyze the metabolic behavior, the metabolic allocation, the levels of lipid peroxidation and the activity of antioxidant enzymes of the species. Thirty animals from each sex were used each season of the year, which were collected at Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza (CPCN) Pró-Mata, located at São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul. In the field, animals were euthanized by cryoanesthesia and in the laboratory they were homogenized in order to quantify levels of total proteins, glycogen, lipids, triglycerides, glycerol lipid peroxidation and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase. There was significative difference in the levels of glycogen, lipids, triglycerides, lipoperoxidation and in the activity of the enzymes superoxide dismutase and glutathione S-transferase over a full seasonal cycle in both males and females. The results of biomarkers from energetic metabolism and from oxidative stress indicate a feeding trend directed to the ingestion of proteins, and it is also suggested that the reproductive period of the species may be long-lasting, with this hypothesis being based also on the observation of pregnant females in many of the analyzed seasons. It is also suggested that there may be a reproductive peak during autumn. However, more studies must be done with this species so that the knowledge about its reproductive biology, general ecology and physiology can be increased. The present work also reinforces the idea that must be a greater interaction between different scientific fields so that a more precise profile of any given organism can be stated.

Key words: conservation physiology, crustacean, amphipod, seasonal variation, energetic metabolism, oxidative stress.

Apresentação

O presente trabalho, sob o título “Estudo sazonal do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo de *Hyalella kaingang* (CRUSTACEA, HYALELLIDAE) em ambiente natural”, é um dos itens de exigência para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

A apresentação dos resultados obtidos para a composição da dissertação é composta por um capítulo, redigido em forma de artigo científico, o qual será posteriormente traduzido para a língua inglesa e encaminhado à publicação na revista “Journal of Comparative Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology”.

A pesquisa foi desenvolvida nos campos relacionados à bioquímica metabólica, fisiologia comparada, ecofisiologia e fisiologia da conservação. O trabalho procurou realizar uma avaliação sazonal acerca de diversos parâmetros metabólicos relacionados ao metabolismo energético, bem como avaliar possíveis variações sazonais do *status* oxidativo, como a atividade de enzimas antioxidantes e os níveis de peroxidação lipídica. Com os resultados, foi realizada uma caracterização de como a espécie se comporta fisiologicamente ao longo do ano em termos de mobilização de reservas energéticas e oscilações naturais em seu balanço oxidativo.

Introdução Geral

Os ecossistemas, em todo o mundo, enfrentam atualmente, em maior ou menor escala, interferências que resultam de alguma ação humana. O desenvolvimento acelerado de indústrias, o crescimento exponencial dos centros urbanos e o aumento de atividades rurais têm potencial para interferir em ciclos naturais de flora e fauna ao seu redor. Esses fatores acabam muitas vezes por modificar as paisagens, diminuir a área de distribuição de organismos ou liberar resíduos poluentes em seus habitats. Estudos de conservação e manejo ambiental, cada vez mais, intensificam esforços para identificar problemas e restaurar ecossistemas degradados e aplicar técnicas de utilização de recursos de forma sustentável (Cooke et al. 2013).

Os campos da região sul do Brasil são locais com uma diversidade biológica muito grande. A alta diversidade de espécies faz com que a região seja um importante centro de estudos de caráter conservacionista, uma vez que o uso inadequado da terra e a cultura de espécies exóticas têm ameaçado a sua integridade. O aumento na produção de alimentos como arroz, soja, milho e trigo, bem como o potencial comercial do cultivo de árvores exóticas para indústrias de celulose acabam por diminuir as áreas originais de campo, e o uso de compostos químicos empregados nas técnicas agrárias pode afetar organismos não-alvo. A modificação dessas áreas naturais, bem como o incremento do plantio de monoculturas danifica e compromete as comunidades locais e conseqüentemente diminui a biodiversidade local (Overbeck et al. 2009). Dessa forma, a melhor maneira para ampliar os esforços de manutenção e conservação é estudar e levantar o maior número de informações de uma espécie em seu habitat natural, para que seja feita uma melhor análise comparativa dos eventuais distúrbios que possam afetar o progresso e a existência de uma população.

De acordo com Cooke e colaboradores (2013), o entendimento dos mecanismos específicos relacionados aos problemas de conservação tem se tornado cada vez mais importante em decisões de resolução acerca de perturbações ambientais. Parte disso é relacionada à “grande utilidade das ferramentas e conhecimentos fisiológicos para estabelecer relações de causa e efeito”. O autor ainda defende a ideia de que avanços significativos em termos conservacionistas e manejo de recursos naturais necessitam de integração entre áreas diversificadas da ciência, e que as ferramentas oferecidas pela fisiologia da conservação são uma peça fundamental para entender e lidar com os problemas ambientais. Tal ramo dessa ciência ainda inclui a caracterização da

diversidade biológica e o estudo de respostas de um organismo frente às variáveis ambientais naturais em que ele está exposto (Cooke et al. 2013), o que acaba por apoiar e justificar a importância de trabalhos que visam o estudo de variações sazonais e circadianas *in situ*, sob uma ótica ecológica, fisiológica.

Dentro dos princípios inseridos no conceito de fisiologia da conservação, o estabelecimento de espécies bioindicadoras de qualidade ambiental é um importante passo para criar ferramentas padronizadas de monitoramento. Portanto, para que se tenham informações básicas, porém de extrema importância, em termos de conhecimento da biodiversidade, e visando gerar dados para futuros projetos de conservação ambiental, deve ser ampliado o conhecimento das estratégias adaptativas de organismos em ambientes naturais, explorando, entre outros aspectos, a capacidade de alocação energética e os requerimentos nutricionais, podendo eventualmente diagnosticar períodos de vulnerabilidade natural; permitindo assim, adotar o uso dos marcadores fisiológicos como parte de programas de monitoramento ambiental em longo prazo (Tracy et al. 2005; Stevenson 2006; Cooke et al. 2013).

Com esses recursos, pode-se fazer uma padronização das variações bioquímicas sazonais de uma espécie, podendo futuramente comparar o modelo de distribuição de reservas em ambiente natural com experimentos onde a mesma espécie enfrente algum distúrbio ambiental. Portanto, com a padronização de espécies consideradas bioindicadoras de qualidade ambiental, é possível diagnosticar alterações fisiológicas no ciclo de vida de organismos sujeitos a alterações ambientais que não fazem parte de seu ciclo de vida.

Dentre os principais biomarcadores utilizados para a caracterização de espécies em ambiente natural, encontram-se os marcadores relacionados ao metabolismo energético. Existem muitos trabalhos que abordam parâmetros do metabolismo intermediário, como níveis de proteínas, glicogênio, glicose e lipídios associados ao ciclo circadiano e à sazonalidade da espécie, estabelecendo conexões com seu ciclo de vida e com variáveis ambientais, como temperatura e fotoperíodo (Oliveira et al. 2003; Dutra et al. 2007; Sroda e Cossu-Leguille 2011). Além disso, os resultados obtidos a partir de estudos ecofisiológicos podem ser utilizados para reforçar dados já existentes sobre a ecologia de uma espécie, como a alimentação, períodos de maior atividade reprodutiva ou muda.

A literatura apresenta relações importantes entre níveis de metabólitos associados aos hábitos alimentares de uma espécie. O estudo do metabolismo

intermediário em crustáceos apresenta grande variabilidade inter e intra-específica, resultado de diversos fatores, como por exemplo seu hábitat, estágio de muda, dieta ou maturidade sexual (Giusto e Ferrari 2014). Um trabalho analisando a sazonalidade de duas espécies simpátricas dos anfípodos *Hyaella castroi* e *Hyaella pleoacuta* foi capaz de aprofundar os conhecimentos acerca dos hábitos alimentares das espécies a partir das análises de quantificação de glicogênio e de proteínas totais desses animais (Dutra et al. 2007), relacionando alguns hábitos de cada espécie com os níveis registrados de cada metabólito encontrado nas respectivas amostras. Nesse estudo, os autores sugerem que *H. castroi* apresenta uma dieta voltada para o consumo de proteínas, o que estaria associado com o fato de a espécie explorar o sedimento, onde se pode encontrar uma grande quantidade de matéria orgânica de origem animal. Por outro lado, *H. pleoacuta* é uma espécie que explora as colunas de água, onde é possível encontrar uma grande quantidade de matéria orgânica de origem vegetal, razão pela qual os autores sugerem que a dieta desta espécie é baseada no consumo de carboidratos. Compostos do metabolismo intermediário como proteínas, carboidratos e lipídios também estão presentes em etapas do período reprodutivo, como na segunda fase da vitelogênese, etapa em que uma grande quantidade de vitelo é depositada nos oócitos (Adiyodi e Subramoniam 1983; Talbot e Helluy 1995).

O estudo de lipídios também é relevante em trabalhos acerca do metabolismo intermediário, uma vez que tais compostos são fundamentais na estruturação e manutenção da integridade fisiológica de membranas celulares, além de apresentarem um papel no transporte de substratos através do sistema circulatório tanto de invertebrados como vertebrados (O'Connor e Gilbert 1968). Quingley e colaboradores (1989), ao estudar a relação entre a composição lipídica e o tamanho e maturidade do anfípodo *Pontoporeia hoyi* constatou uma diferença intraespecífica em níveis de triglicérides, os quais foram encontrados em maior quantidade nas fêmeas da espécie, considerando ainda que uma grande parcela dos compostos lipídicos é transferida das fêmeas para sua futura prole (Quingley et al. 1989; Cavaletto et al. 1996).

A conservação de um ambiente natural é fundamental para que o ciclo de vida de uma espécie se mantenha, e uma importante parte disso está relacionada à manutenção dos hábitos alimentares de um organismo. Atualmente, sabe-se que artrópodes não são capazes de realizar a síntese *de novo* de compostos como o colesterol, sendo conseqüentemente obrigatória a sua obtenção a partir da dieta (Grieneisen 1994), uma vez que a molécula tem um papel importante na síntese de

ecdisteroides, responsáveis pela modulação do ciclo de muda (Böcking et al. 1993; Mykles 2011).

Muitos estudos sobre a sazonalidade metabólica incluem análises relacionadas ao balanço oxidativo do animal, verificando atividade de enzimas antioxidantes, níveis de lipoperoxidação e outras moléculas antioxidantes (Sroda e Cossu-Leguille 2011; Paital e Chainy 2013; Schvezov et al. 2013). Investigações acerca do status oxidativo de um determinado grupo costumam quantificar as atividades de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutationala peroxidase (GPx), a glutationala redutase (GR) e a glutationala-S transferase (GST) (Hermes-Lima 2004; Koenig e Solé 2012), visando assim analisar os níveis naturais da diferença entre a formação de espécies reativas de oxigênio e sua respectiva neutralização. Baseado nisso, são estabelecidas associações importantes para o entendimento fisiológico da espécie em seu hábitat natural, determinando períodos de maior vulnerabilidade em termos de balanço oxidativo.

De acordo com Lushchak (2011), a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um processo dinâmico, uma vez que tanto sua produção quanto sua eliminação devem ser equilibrados. Porém, algumas razões podem perturbar esse equilíbrio, determinando o que se conhece por estresse oxidativo. O termo estresse oxidativo faz referência a um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e as defesas antioxidantes do organismo (Sies 1991). Os animais podem apresentar um desbalanço oxidativo devido a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e/ou por diminuição na sua capacidade de defesa (Halliwell e Gutteridge 2007). Essas espécies reativas são moléculas cuja capacidade de oxidação é potencialmente prejudicial, causando disfunções metabólicas e morte celular (Halliwell e Gutteridge 2007). Animais aeróbicos foram evolutivamente equipados para lidar com desajustes oxidativos, e são portadores de diversos mecanismos para combater tais danos, como enzimas (exemplo: SOD, CAT, GPx) e outras moléculas (exemplo: carotenoides, glutationala reduzida) (Halliwell e Gutteridge 2007).

Dentre os crustáceos do gênero *Hyalella* Smith, 1874 o qual é constituído atualmente por mais de 65 espécies descritas, distribuídas exclusivamente no continente americano (Baldinger 2004), existem diversas espécies de ocorrência regional que já foram utilizadas em trabalhos na área da ecofisiologia, como *H. castroi* (Gering et al. 2009; Dutra et al. 2011), *H. curvispina* (Dutra et al. 2008a; Dutra et al. 2008b), e *H.*

pleoacuta (Dutra et al. 2008a; Dutra et al. 2007). É um gênero cuja coleta e cultivo são relativamente simples, onde a muda e o pareamento em períodos reprodutivos são facilmente perceptíveis, ea maturação do ovário, oviposição e incubação dos ovos podem ser observados pelo corpo translucido do animal (Kruschwitz 1978). Há ocorrência de um dimorfismo sexual em que os machos apresentam o segundo par dos gnatópodos alargado, enquanto as fêmeas são portadoras de um marsúpio, onde são depositados os ovos. O primeiro e o segundo par de gnatópodos nos machos são utilizados para carregare para o manejo físico da fêmea durante a cópula, respectivamente (Kruschwitz 1978; Wellborn 2000). Segundo Kruschwitz (1978), em *Hyaella* o comportamento de amplexo é geralmente iniciado alguns dias antes da muda das fêmeas, e após a cópula, os ovos são colocados no marsúpio da fêmea, onde o esperma já foi depositado.

Recentemente foi descrita uma nova espécie do gênero *Hyaella* (Bueno et al. 2013), registrada como *Hyaella kaingang*. Essa espécie ocorre em ambientes de água doce, e tal registro foi feito a partir de indivíduos distribuídos no riacho Garapiá, uma porção da bacia hidrográfica do Rio Mambituba, localizado no município de São Francisco de Paula, RS. Devido ao tempo que essa espécie é conhecida, pouco se sabe sobre ela além dos dados morfológicos e ecológicos presentes em sua descrição, e nada se sabe sobre suas características bioquímicas e fisiológicas.

Os anfípodos costumam ser organismos importantes em suas comunidades, sendo um elo relevante na cadeia alimentar. O estudo de espécies novas, bem como o entendimento da estocagem/alocação de reservas energéticas e do balanço oxidativo, podem contribuir para o melhor entendimento da espécie e de suas adaptações ao meio ambiente.

Considerando todos os pontos citados anteriormente, este trabalho visa analisar os níveis de reservas energéticas e do balanço oxidativo em indivíduos de *Hyaella kaingang* coletados nas diferentes estações do ano em seu ambiente natural, estabelecendo um padrão bioquímico-funcional *in situ* e, possibilitando em estudos futuros que estas variáveis e a própria espécie possam ser utilizadas como biomarcador e bioindicador, respectivamente, para ambiente límnico.

Posteriormente, os resultados obtidos sobre a fisiologia da espécie podem auxiliar também, trabalhos na área da fisiologia comparada, da fisiologia da conservação e da ecotoxicologia, a fim de avaliar as alterações metabólicas por ensaios biológicos, como por exemplo, em situações de exposição à xenobióticos, ou em períodos de completa escassez alimentar ou alteração em níveis de oxigênio dissolvido na água.

CAPITULO I

ESTUDO SAZONAL DO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO E DO BALANÇO OXIDATIVO DE *Hyaella kaingang* (CRUSTACEA, HYALELLIDAE) EM AMBIENTE NATURAL

Estudo sazonal do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo de *Hyaella kaingang* (CRUSTACEA, HYALELLIDAE) em ambiente natural

Braghirolli, F.M.¹; Oliveira, M. R.¹; Oliveira, G.T.¹

1. Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfofisiológicas - Laboratório de Fisiologia da Conservação.

Correspondência:

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

Brasil

Telefone: 55-51-33203545 (ext. 8324)

Fax 55-51-3320-3612

E-mail: guendato@pucrs.br

G.T.Oliveira

Bolsista de Produtividade do CNPq, Brasília, Brasil (Processo: 307303/2012-8)

1. Introdução

De acordo com Cooke e colaboradores (2013), a caracterização da diversidade biológica e suas implicações ecológicas, bem como a predição de como organismos respondem às alterações ambientais define o conceito de fisiologia da conservação. Uma grande e importante parcela desses estudos deve, portanto, ampliar o conhecimento das adaptações de uma determinada espécie em seu ambiente natural, tendo em vista explorar as alocações energéticas relevantes ao crescimento e a reprodução, bem como detalhar as necessidades nutricionais em ambiente natural ou em cativeiro para diagnosticar possíveis problemas e períodos de vulnerabilidade, e utilizar marcadores fisiológicos com parte de programas de monitoramento ambiental em longo prazo (Tracy et al. 2005; Stevenson 2006; Cooke et al. 2013).

O gênero *Hyaella* Smith, 1874 atualmente inclui mais de 65 espécies distribuídas ao longo de todo o continente americano, com 23 espécies de ocorrência no território brasileiro (Baldinger 2004; Bueno et al. 2013). Esses animais são encontrados associados à vegetação aquática, ao sedimento ou nadando em colunas d'água, além de serem considerados de extrema importância à fauna bentônica e à cadeia trófica como fonte alimentar de peixes, anfíbios e aves (Hargrave 1970; Kruschwitz 1978; Pilgrim e Burt 1993). Portanto, constituem um elo vital de transferência energética entre algas e consumidores de níveis superiores.

Diversas espécies enquadradas no gênero são alvo de pesquisas relacionadas à taxonomia, ecologia e aspectos evolutivos (Strong Jr 1973; Wellborn 1994). Além disso, esses animais costumam ser amplamente utilizados em ensaios como organismos bioindicadores de xenobióticos (Negro et al. 2013; Giusto e Ferrari 2014), tendo em vista sua facilidade de coleta, de cultivo e de claro dimorfismo sexual, além de serem abundantes em ambiente aquático (Kruschwitz 1978; Wang et al. 2014). Faz-se necessário, porém, o incremento de levantamentos prévios aos testes toxicológicos com relação aos aspectos fisiológicos em ambiente natural dessas espécies.

Dentre os principais biomarcadores utilizados para a caracterização de espécies em ambiente natural, encontram-se os marcadores relacionados ao metabolismo

energético. Existem alguns trabalhos que abordam parâmetros do metabolismo intermediário, como níveis de proteínas, glicogênio, glicose e lipídios associados ao ciclo circadiano e à sazonalidade da espécie, estabelecendo conexões entre seu ciclo de vida com variáveis ambientais, como a temperatura e o fotoperíodo (Oliveira et al. 2003; Dutra et al. 2007; Sroda e Cossu-Leguille 2011). Além disso, os resultados obtidos a partir de estudos ecofisiológicos podem ser utilizados para reforçar dados já existentes sobre a ecologia de uma espécie, como a alimentação, períodos de maior atividade reprodutiva ou muda.

De forma semelhante, vários estudos sobre a sazonalidade incluem análises relacionadas ao balanço oxidativo de animais, verificando a atividade de enzimas antioxidantes, níveis de lipoperoxidação e outras moléculas antioxidantes (Sroda e Cossu-Leguille 2011; Paital e Chainy 2013; Schvezov et al. 2013). Investigações acerca do *status* oxidativo de um determinado grupo costumam quantificar as atividades de enzimas como a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase, a glutathione reductase e a glutathione S-transferase (Hermes-Lima 2004; Koenig e Solé 2012), visando assim analisar os níveis naturais da diferença entre a formação de espécies reativas de oxigênio e sua respectiva neutralização. Baseado nisso, são estabelecidas associações importantes para o entendimento fisiológico da espécie em seu hábitat natural, determinando períodos de maior vulnerabilidade em termos de balanço oxidativo.

Assim sendo, o objetivo desse trabalho é realizar uma avaliação sazonal de alguns marcadores fisiológicos relacionados ao metabolismo energético e ao balanço oxidativo de *Hyalella kaingang*. Esse anfípodo foi descrito recentemente (Bueno et al. 2013) e ainda não existem registros acerca de sua distribuição, biologia reprodutiva ou ecologia geral. Uma vez estabelecido o perfil bioquímico-funcional da espécie, também é possível que a espécie seja candidata ao desenvolvimento de ensaios toxicológicos e a se tornar um organismo bioindicador de qualidade de ambientes dulciaquícolas.

2. Materiais e métodos

Todos os experimentos do presente trabalho foram realizados sob as permissões legais responsáveis pelos regimentos de usos de animais em pesquisa, como o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob o código de autorização SISBIO 43587-1, bem como o Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), sob a autorização de número 14/00401.

2.1 Procedimentos de campo

A amostragem foi realizada ao longo do ano de 2014, sempre no mês central de cada estação do ano (fevereiro, maio, agosto e novembro); os indivíduos de *H.kaingang* foram coletados em um tanque de alvenaria no Centro de Pesquisas e Conservação da Natureza (CPCN) Pró-Mata (São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, Brasil) que recebe água do riacho Guarapiá (UTM 577600N; 6737200E), caracterizando-se como uma área de baixa influência antrópica. O procedimento de captura foi realizado com o auxílio de peneiras de malha fina, e foram coletados 30 animais de cada sexo, sendo devolvidos ao habitat as fêmeas ovígeras e animais excedentes. A seguir, os indivíduos eram acondicionados em tubos plásticos com capacidade de 2 ml e então, eram eutanasiados em banho de gelo e mantidos congelados até sua transferência para o laboratório. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Conservação, nas dependências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre.

Juntamente com a coleta dos anfípodos, foram registradas informações relacionadas ao ambiente do qual os animais foram retirados, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade da água do tanque (tabela 1). Também era feita em cada coleta uma amostragem da água do tanque, para posterior análise de parâmetros químicos (matéria orgânica, nitrito, nitrato, fósforo total e dureza) (tabela 2).

2.2 Procedimentos de laboratório

Para os ensaios de cada estação, os 30 animais coletados de cada sexo eram divididos em três *pools*: o primeiro, com 6 animais, para a quantificação de proteínas totais e glicogênio; o segundo, com 8 animais, para a quantificação de lipídios totais, triglicerídeos e glicerol; e o terceiro, com 16 animais, para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione S-

transferase (GST), além da quantificação dos níveis de lipoperoxidação (TBARS). Todos os ensaios nos *pools*, tanto de metabolismo quanto de estresse oxidativo e lipoperoxidação, foram dosados em quintuplicata. O peso médio dos animais coletados foi de 0,029g nos indivíduos machos e 0,019g nas fêmeas.

2.2.1 Preparação e quantificação das amostras para ensaios de metabolismo

Para a extração do glicogênio, foi utilizado o método descrito por Van Handel (1965), com posterior quantificação deste polissacarídeo como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃). Foi utilizado kit comercial da Labtest (Ref.: 84) que segue o método da glicose oxidase, onde o produto final da reação apresenta uma coloração vermelha, cuja intensidade é proporcional à concentração de glicose na amostra, detectada à 500nm.

Os níveis de proteínas totais foram quantificados no meio de extração do glicogênio, utilizando kit comercial da Labstest (Ref.:99) cujo princípio químico baseia-se na reação de íons de cobre com ligações peptídicas das proteínas séricas. O produto dessa reação forma um composto de coloração púrpura que tem absorvância máxima em 525nm.

Os lipídios totais, triglicerídeos e glicerol livre foram extraídos pelo método do clorofórmio: metanol (2:1) descrito por Folch e colaboradores (1957). Os níveis de lipídios totais foram determinados através do método da sulfosfovanilina, descrito por Frings e Dunn (1970), sob absorvância máxima de 530 nm. Os níveis de triglicerídeos foram quantificados através de kit da Labtest (triglicerídeos GPO-ANA- Referência nº 87), com absorvância máxima em 520 nm e a quantificação dos níveis de glicerol livre foram feitas a partir de kit comercial (Thermo Scientific- Ref: 5360), com absorvância de 340 nm.

Os resultados dos parâmetros metabólicos foram expressos em mg do metabólito por g do *pool* de animais.

2.2.2 Preparação do homogeneizado para ensaios enzimáticos e lipoperoxidação

O *pool* de animais foi pesado e para cada grama do *pool* foi acrescentado 5 ml de uma solução formada por tampão fosfato (20mM) acrescido de fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), com concentração de 100mM (inibidor de proteases), em uma proporção de 100:10. Na sequência, o *pool* era homogeneizado em um Ultra-Turrax (IKA-WERK), em banho de gelo (0-4°C). O produto desse procedimento era centrifugado em uma centrífuga refrigerada (4°C) por 10 minutos a 3000rpm (SORVALL RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge). Após, era retirada a porção sobrenadante e congelada em freezer -80°C para dosagens posteriores (Lleusy et al. 1985), e a fração precipitada era descartada. Uma fração da amostra do sobrenadante era usada para a quantificação das proteínas no homogeneizado usando kit da LABTEST (Ref.:99).

a) Superóxido dismutase (SOD):

A técnica para a determinação da atividade dessa enzima é baseada na inibição da reação do ânion superóxido com a epinefrina. Uma vez que não é possível estabelecer a concentração da enzima ou sua atividade (substrato consumido/tempo), foi utilizado a quantificação em unidades relativas, onde uma unidade de SOD equivale à quantidade de enzima que inibe 50% a velocidade de formação da oxidação do detector (no presente estudo: epinefrina). Esse processo de oxidação forma o adenocromo, produto cuja coloração é detectada espectrofotometricamente. Por fim, a atividade da enzima é estimada medindo a velocidade de formação do adenocromo, observada a 480nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH(50mM, pH11) e epinefrina (1mM) (Boveris et al. 1982).

b) Catalase (CAT)

Esta enzima tem uma configuração bioquímico-estrutural que lhe atribui especificidade apenas a compostos específicos, como o peróxido de hidrogênio e hiperperóxidos de metila e etila (Webster e Nunn 1998), apresentando uma atividade diretamente proporcional à taxa de decomposição de seu substrato. Dessa forma, a determinação da atividade da catalase pode ser quantificada pela análise do consumo de peróxido de hidrogênio (Morgan-Martins 2003). Utilizou-se, em cubeta de quartzo, 955 µL de tampão de fosfato de sódio (5 mM; pH7,4) e 10 µL da amostra. Em seguida, era feita uma calibração no aparelho com essa leitura inicial igualando-se a zero, e então,

adicionava-se 35 μL de peróxido de hidrogênio (0,3M) para o início da leitura. Os resultados foram expressos em nmoles por mg de proteína por minuto de reação, sob comprimento de onda de 240nm (Boveris e Chance 1973).

c) Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da glutathione S-transferase foi medida de acordo com método descrito (Boylard e Chasseaud 1969), o qual consiste na 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 e os resultados expressos em nmoles de conjugado CNDB. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteínas}^{-1}$.

d) Níveis de lipoperoxidação

A quantificação dos níveis de lipoperoxidação foi determinada pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), o qual reage com diversos tipos de aldeídos, como o malondialdeído, que são produtos do processo da peroxidação lipídica. Para tal, eram colocados em tubos de ensaio 0,2mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%, 0,1mL de água destilada, 0,3mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 0,1mL do homogeneizado. O TBA forma uma base de Schiff a partir da reação com os produtos da lipoperoxidação e o TCA age desnaturando proteínas e acidificando o meio da reação.

Na sequência, os tubos eram colocados em um agitador (Biomatic) e aquecidos durante 15 minutos à temperatura de 100°C. A seguir, os tubos eram resfriados e acrescentava-se 0,6mL de álcool n-butílico a fim de extrair o pigmento formado. Os tubos eram novamente agitados por 45 segundos e centrifugados por 10 minutos a 3000rpm. Ao final, o produto corado era retirado e a leitura feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm (CARY 3E – UV – Visible Spectrophotometer Varian). O resultado final dos níveis de lipoperoxidação foram expressos em nmoles/mg de proteínas (Buege e Aust 1978).

2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média \pm erro padrão, testados quanto a sua distribuição através do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e a homogeneidade analisada pelo teste de Levene. Para dados paramétricos foi realizada uma análise de variância de uma via (ANOVA), com correção de Bonferroni no caso em que $p > 0,05$ para o teste de Levene e, Games-Howell quando $p < 0,05$ obtidos no teste de homogeneidade. Estas análises estatísticas foram realizadas com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows, versão 20.0. Para dados não paramétricos realizou-se o teste de Kruskal-Wallis (Bioestat - versão 5.3), com teste complementar de Dunn. Os resultados obtidos para os diferentes sexos foram comparados através de análise de variância de duas vias. O nível de significância adotado foi de 5% (Zar 1996).

3. Resultados

3.1 Metabolismo intermediário

Os resultados mostram que, em machos, houve diferença significativa entre os níveis de proteínas totais entre o inverno e a primavera e entre verão e inverno ($p < 0,05$). Nas fêmeas, foi registrada diferença entre inverno e outono, e entre inverno e verão ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre os sexos ao longo do período de estudo ($p > 0,05$). Os níveis de proteínas encontrados foram maiores no inverno (para ambos os sexos), enquanto que os níveis mais baixos foram registrados na primavera em machos, e no verão nas fêmeas (fig. 1).

Os níveis de glicogênio nos machos apresentaram diferença significativa entre inverno e verão, e outono e inverno ($p < 0,05$). Nas fêmeas, houve diferença significativa entre inverno e primavera, e entre verão e inverno ($p < 0,05$). Os resultados apontaram diferenças significativas entre sexos ($p < 0,05$). No inverno, estação em que ambos os sexos apresentam quantidades mais elevadas de glicogênio, os níveis deste polissacarídeo nas fêmeas encontram-se 2,28 vezes mais elevados que os níveis dos machos. Após o pico no inverno, a quantidade de glicogênio das fêmeas diminuiu 6,04 vezes na primavera (níveis mais baixos) e para os machos, os níveis mais baixos foram registrados no verão (fig.1).

Os níveis de lipídios totais nos machos de *H.kaingang* diferiram significativamente entre primavera e verão e entre primavera e outono ($p < 0,05$). Nas fêmeas, os lipídios variaram entre o verão e os meses de outono e de primavera, entre o outono e o inverno e primavera, e entre inverno e a primavera ($p < 0,05$). Os testes apontaram diferença significativa entre os sexos ao longo das por estações ($p < 0,05$). Os maiores níveis presentes nos machos foram encontrados na primavera, estação onde foram encontrados os menores níveis do metabólito nas fêmeas, com a diferença entre os sexos sendo de 5,37 vezes maiores para os machos. Os valores encontrados mais altos, nas fêmeas, foram registrados no outono, estação em que os machos apresentaram os menores valores de lipídios totais, com a diferença entre os sexos sendo de 17,66 vezes maior nas fêmeas (fig 2).

Os valores de triglicerídeos nos machos não apresentaram diferenças significativas entre as estações ($p > 0,05$); já para as fêmeas foi observada uma diferença significativa entre as estações outono e primavera ($p < 0,05$). Houve também diferenças significativas entre os sexos ($p < 0,05$). Os níveis de triglicerídeos das fêmeas foram mais altos que os níveis dos machos em todas as estações, com exceção da primavera, onde foram registrados os maiores valores para os machos e os menores para as fêmeas, com uma diferença de 3,88 vezes. Os maiores valores encontrados nas fêmeas foram no outono, onde a diferença com relação aos valores encontrados em machos para a mesma estação é de 4,38 vezes maior (fig. 2).

Os níveis de glicerol observados nos machos apresentaram diferenças significativas entre verão e inverno ($p < 0,05$). Nas fêmeas, foi observada uma diferença estatística entre outono e inverno ($p < 0,05$). Na primavera, em ambos os sexos, a presença do metabólito não foi detectada. Os valores mais altos de glicerol, tanto para os machos quanto para as fêmeas, foram encontrados no inverno. No verão foram encontrados os valores mais baixos de glicerol para os machos, enquanto que nas fêmeas, os menores níveis foram registrados no outono (fig. 2).

3.2 Enzimas antioxidantes e lipoperoxidação

A atividade da superóxido dismutase em machos apresentou diferença significativa entre inverno e verão, e entre inverno e primavera ($p < 0,05$), ao passo que

nas fêmeas, a atividade da enzima não apresentou diferenças significativas entre nenhuma das estações avaliadas ($p>0,05$). Os testes indicaram diferenças significativas entre o padrão de resposta anual de machos e de fêmeas ($p<0,05$). Os níveis de atividade enzimática nos machos apresentaram um pico no inverno, em que chegam a ser até 2,03 vezes maiores que os das fêmeas no mesmo período e 2,27 vezes mais altos que no outono; já as fêmeas apresentam seus níveis mais elevados na primavera. Os níveis mais baixos de atividade enzimática em machos e fêmeas foram diagnosticados no verão e no outono, respectivamente (fig. 3).

Os níveis de atividade da catalase nos machos apresentaram diferença significativa entre inverno e primavera ($p<0,05$), enquanto que nas fêmeas, foi apontada uma diferença estatística entre verão e outono ($p<0,05$). Os valores mais altos relacionados à atividade da enzima em machos foram diagnosticados no inverno, e os valores mais baixos na primavera, estação em que a atividade caiu 7,89 vezes. Nas fêmeas, os valores de atividade mais altos ocorreram no verão, tendo uma queda de 21,51 vezes no outono, estação onde os níveis de atividade foram mais baixos no grupo (fig. 3). No entanto, não foram diagnosticadas diferenças significativas entre sexos ($p>0,05$).

Os dados da atividade da enzima glutathione S-transferase apresentaram diferença significativa nos machos entre as estações outono e primavera, e entre inverno e todas as outras estações ($p<0,05$). Nas fêmeas, foram apontadas diferenças significativas entre primavera e o verão e outono, e entre o inverno e as demais estações ($p<0,05$). Os valores de atividade mais baixos para ambos os sexos foram encontrados no inverno. Os níveis aumentam gradualmente até atingirem seu pico no outono, onde as atividades são 3,81 e 3,08 vezes maiores do que no inverno em machos e fêmeas, respectivamente (fig. 3). Em todas as estações, a atividade das fêmeas foi maior que a dos machos. Os testes estatísticos apontaram diferenças significativas entre os sexos ($p<0,05$) ao longo das estações.

Nos machos, os níveis de lipoperoxidação apresentaram diferença estatística entre o inverno e o verão, bem como entre inverno e outono ($p<0,05$). Nas fêmeas, foi apontada uma diferença significativa entre verão e inverno e entre verão e primavera ($p<0,05$). Os testes mostraram também, diferenças significativas entre os sexos ao longo das estações do ano. Para ambos os sexos, o verão foi à estação onde os níveis de

lipoperoxidação estavam mais altos, diminuindo no outono e atingindo seus valores mais baixos no inverno nos machos (19,58 vezes menor do que no verão) e, na primavera nas fêmeas (4,72 vezes menor do que no verão) (fig. 3).

4. Discussão

Até o presente, *H. kaingang* foi encontrada somente na região onde foi realizado o estudo, embora levantamentos mais amplos de sua ocorrência ainda não tenham sido realizados. Os animais foram capturados predominantemente em associação ao solo do ambiente aquático em que se encontram, sendo possível que explorem material orgânico depositado no substrato para sua alimentação e/ou este como abrigo. Estas características associadas com os altos níveis de proteínas totais encontradas e com níveis de glicogênio proporcionalmente inferiores permitem supor que esta espécie apresente um hábito alimentar voltado à ingestão de proteínas, explorando predominantemente o substrato. Embora não se tenha dados na literatura acerca dos hábitos alimentares desses anfípodos, os resultados indicam que esses animais sejam detritívoros, podendo aproveitar material orgânico de origem animal presente no sedimento.

A literatura aponta relatos semelhantes relacionando hábitos de forrageio com o metabolismo energético. Dutra et al. (2007) em um estudo avaliando a sazonalidade das reservas energéticas em duas espécies de *Hyaletta*, estabeleceu uma correlação entre os hábitos de exploração do sedimento e os teores de proteínas totais e glicogênio encontrados em *H. castroi*. Resultados semelhantes foram encontrados em *Hyaletta curvispina*, apontando uma dieta em ambiente natural mais rica em proteínas do que em carboidratos (Dutra et al. 2008). Kucharski e Da Silva (1991) também estabeleceram tais relações após estudar estes metabólitos no caranguejo do estuário *Neohelice granulata* submetido à dieta rica em carboidratos ou proteínas.

Com exceção da publicação relatando a descrição da espécie *Hyaletta kaingang* (Bueno et al. 2013), pouco se sabe atualmente sobre os padrões biológicos e ecológicos da espécie, principalmente acerca de sua biologia reprodutiva. Foram encontradas fêmeas ovígeras principalmente durante o outono e em menor número no inverno e na

primavera, bem como machos pareados com fêmeas em todas as estações de coleta, o que pode ser um indício de um longo período reprodutivo, do outono até primavera, com um pico nos meses de outono. No entanto, um aprofundamento do ciclo de vida da espécie deve ser realizado. Em outra espécie de anfípodo *H.pleoacuta*, que também ocorre na região dos campos de cima da serra, foi constatado um padrão reprodutivo semelhante, com um pico reprodutivo nos meses de outono (Dutra et al.2007).

Os níveis de proteínas totais não divergiram estatisticamente entre machos e fêmeas durante as estações. Em ambos os sexos foram registrados os valores máximos de proteínas durante o inverno, enquanto que os níveis mais reduzidos foram encontrados durante a primavera e o verão para machos e fêmeas, respectivamente. Sroda e Cossu-Leguille (2011), em um estudo sazonal de biomarcadores no gamarídeo *Gammarus roeseli*, encontrou níveis de proteínas totais semelhantes, com um pico no inverno, diminuindo gradualmente e mantendo níveis baixos até o verão. O uso de proteínas totais, tanto em machos como fêmeas, durante a passagem do inverno para a primavera pode relacionar-se a uma diminuição do metabolismo e utilização destas moléculas para a manutenção da homeostase energética (síntese de ATP) bem como a produção de glicose através da gliconeogênese em sítios específicos, visto que no inverno verificamos os mais baixos valores de temperatura ambiental, tanto no ar como na água onde os animais foram coletados (Tabela 1). Estudos em crustáceos demonstram a presença de capacidade gliconeogênica a partir de aminoácidos em diferentes órgãos de crustáceos (Oliveira e Da Silva, 1993; Chittó et al. 2009).

Tal hipótese é reforçada pelos baixos valores de lipoperoxidação (TBARS) verificados em ambos os gêneros no inverno. Sabe-se que o TBARS é uma medida dos produtos gerados pela ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre as membranas biológicas, onde as quais promovem reações em cadeia, gerando radicais lipídicos. A mitocôndria é o principal local de produção dessas espécies reativas, onde grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio da fosforilação oxidativa, o que implica vários complexos enzimáticos que estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações de reduções oxidativas, tendo como destino final uma molécula de oxigênio. Em circunstâncias normais, o oxigênio é convertido em água no complexo IV e a energia estocada é usada para a produção de ATP no complexo V. Contudo, uma pequena porcentagem do oxigênio, de 1 a 4%,

consumido pela mitocôndria no complexo IV é convertida em uma das várias ERO, em vez de água (Barja 2007; Andrade et al. 2010).

Um padrão semelhante de sazonalidade proteica foi registrado no lagostim *Parastacus varicosus*, cujos maiores níveis de proteínas presentes na hemolinfa foram observados durante o inverno, com uma grande diminuição na primavera e no verão (Castiglioni et al. 2007). Tal estudo sugere que os baixos níveis encontrados seriam consequência de uma preferência no uso de proteínas e carboidratos em períodos de intensificação na atividade reprodutiva, ocorrente no verão.

Foi encontrada uma variação cíclica de glicogênio em ambos os gêneros, com este metabólito apresentando um padrão crescente do outono até o inverno, chegando a valores mínimos no verão. Esse padrão que pode indicar que os animais acumulam glicogênio nos meses de outono possivelmente para que este polissacarídeo seja utilizado como substrato energético ao longo da primavera e do verão, resposta que coincide com um incremento da temperatura e diminuição do pH da água. Tais respostas foram mais intensas nas fêmeas que parecem usar suas reservas de gorduras no outono durante o pico reprodutivo sobrando este polissacarídeo para ser utilizado na manutenção da homeostase energética nas estações subsequentes. Em *Hyaella curvispina*, também é sugerido que exista uma mobilização maior das reservas de gordura durante a reprodução, enquanto outras reservas como proteínas e carboidratos seriam responsáveis pela manutenção energética em outros momentos do ciclo de vida (Dutra et al. 2008).

Resultados semelhantes aos apresentados em hepatopâncreas e músculo da quela de indivíduos machos de *Neohelice granulata*, um caranguejo de estuário (Kucharski and da Silva 1991) bem como em duas espécies de crustáceos de água doce, o anfípodo *Hyaella castroi* (Dutra et al. 2007) e no tecido muscular de fêmeas de *Aegla platensis* (Oliveira et al. 2007), em que níveis altos de glicogênio foram observados no inverno, para ambos os sexos, seguido por uma intensa diminuição até o verão.

No entanto, enquanto as fêmeas de *H. castroi* apresentam valores mínimos de glicogênio no outono, *H. kaingang* apresentou níveis reduzidos na primavera, semelhante às fêmeas de *H. pleoacuta* (Dutra et al. 2007) que também apresentam uma intensa atividade reprodutiva nos meses de outono, como foi sugerido para a espécie em estudo. O crescente nível de glicogênio em fêmeas no outono, atingindo seu pico no inverno, e sua intensa depleção até a primavera pode estar relacionado também à

produção de vitelogenina, uma glicolipoproteína presente no vitelo e principal substrato energético usado pelos embriões em desenvolvimento (Ramamurty 1968; Blanchard et al. 2005). Além disso, é frequentemente apontado como uma importante fonte energética para os comportamentos reprodutivos, como a corte, a guarda pré-copulatória, em que os machos carregam as fêmeas durante o período, a muda pré-cópula e o cuidado parental, onde anfípodos juvenis são carregados dentro de um marsúpio, ambos por parte das fêmeas em *Hyalella* (Kruschwitz 1978).

De acordo com Ramamurty (1968), em alguns grupos de insetos o glicogênio é o último metabólito a ser direcionado à vitelogênese, sendo antecedido por lipídios e proteínas. Os resultados obtidos em *H. kaingang* apresentam um comportamento semelhante no que se refere à mobilização desses metabólitos, uma vez que os níveis de lipídios totais e de triglicerídeos das fêmeas tiveram seus picos no outono, enquanto glicogênio e proteínas totais tiveram níveis mais elevados durante o inverno. Altos níveis de lipídios totais também são reportados no hepatopâncreas de *Parastacus varicosus* (Castiglioni et al. 2007), onde as flutuações nos níveis lipídicos foram relacionadas com o desenvolvimento das gônadas, uma vez que a literatura aponta o hepatopâncreas como sendo um dos principais fornecedores de lipídios para as gônadas em períodos de alta demanda energética, como a gametogênese (Mourente e Rodríguez 1991).

Os níveis reduzidos de lipídios totais em machos durante o outono podem estar relacionados a um aumento da atividade exploratória, como a busca por fêmeas aptas à reprodução, ou ainda o próprio processo reprodutivo como a guarda pré-copulatória, onde o macho passa por um período de restrição alimentar e carrega a parceira por vários dias para garantir a fecundação da fêmea durante seu período fértil (Robinson e Doyle 1985), aumentando assim a demanda energética.

Os altos níveis de lipídios totais e triglicerídeos verificados nas fêmeas no outono, aliado a um aumento da lipoperoxidação em ambos os gêneros também no outono podem representar um aumento na intensidade de alimentação desses animais, ou mesmo uma melhor capacidade de absorção de nutrientes nesse período. Tal padrão parece ser uma resposta adaptativa importante para que eles possam sustentar a demanda energética da reprodução, que parece apresentar um pico nos meses de outono, como também da diminuição do metabolismo nos meses de inverno. Processos de

intensificação na dieta em períodos que antecedem a reprodução também já foram reportados em *Aegla platensis* (Bueno e Bond-Buckup 2004) um anomura de água doce.

Os níveis de triglicerídeos nos machos se mantiveram estatisticamente constantes durante todas as estações, enquanto os níveis das fêmeas apresentaram um pico no outono, juntamente com os maiores níveis lipídicos registrados, onde possivelmente os animais estejam alocando reservas energéticas para os processos envolvidos na reprodução, tais como a síntese de hormônios, lipoproteínas e gametas, além de vitelogenina nas fêmeas (Gilbert e O'Conner 1970; Chang e O'Connor 1983; Racotta et al. 2003). Levando-se em conta o processo de formação de hormônios como o ecdisteróide 20-hidroxiecdisona, um importante modulador dos processos de muda em crustáceos, cabe salientar a importância de aprofundar os estudos acerca dos metabólitos intermediários como o colesterol, cuja origem é presente na própria dieta do animal e é parte importante do ciclo metabólico de formação do hormônio (Mykles 2011). Sabe-se que em algumas espécies de anfípodos as fêmeas realizam uma muda antes da fase copulatória (Borowsky 1978; Kruschwitz 1978; Borowsky 1980) o que altera o padrão metabólico destes animais, aumentando a demanda energética para o crescimento somático e a reestruturação do exoesqueleto.

Tanto em machos quanto nas fêmeas de *H. kaingang*, foram registrados níveis máximos de glicerol durante o período de inverno. Esses resultados, aliados às baixas temperaturas registradas tanto para a região onde a espécie ocorre como na água onde os espécimes foram coletados, sugerem que possa existir uma tendência a um acúmulo de destemetabólito nos períodos mais frios do ano como uma ferramenta de crioproteção. Para evitar danos às estruturas celulares pela formação de cristais, concentrações significativas de crioprotetores são acumuladas por alguns organismos, de forma que o aumento da indução da viscosidade regula a atividade osmótica e a formação de cristais (Brisson et al. 2001). Outras investigações apontam um incremento em substâncias como o glicerol e sorbitol no estágio larval de *Eurosta solidaginis* expostas a condições de baixa temperatura, onde os níveis de glicerol tiveram um aumento inversamente proporcional às temperaturas impostas até chegar a um platô, onde então os níveis de sorbitol tornaram-se mais proeminentes conforme a intensidade do frio aumenta (Storey 1983). É sugerido que regulação do metabolismo nas larvas parece explorar a mudança de temperaturas, efeitos da temperatura na cinética enzimática e interação com enzimas

produzindo as alterações no fluxo metabólico levando à síntese de diferentes polióis (Storey 1983).

Como parte de um sistema enzimático adaptado às funções da vida aeróbica, as enzimas superóxido dismutase e catalase fazem parte da linha primária de defesa contra espécies reativas de oxigênio, sendo fundamentais para a manutenção do balanço oxidativo destes organismos. Elas atuam na transformação do ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) e, na metabolização do peróxido convertendo-o em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), respectivamente (McCord et al. 1971; Hermes-Lima 2004). O ânion superóxido é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória, sendo pouco reativo e não tendo habilidade de penetrar membranas lipídicas. Portanto, sua ação é restrita apenas ao compartimento onde é produzido. Já o H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, uma vez que participa como intermediário na reação que produz o radical hidroxila (OH^\bullet) que tem uma vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (Nordberg e Arnér 2001; Andrade et al. 2010).

A atividade da superóxido dismutase em *Hyaella kaingang* apresentou-se mais alta em machos durante o inverno, coincidindo com os menores valores de lipoperoxidação, tendência também encontrada no grupo das fêmeas na primavera, sugerindo assim, um aumento na formação do radical ânion superóxido e sua metabolização pela SOD. Aliados a uma possível diminuição de atividade dos animais nos meses de inverno após uma intensa atividade reprodutiva, os baixos valores de lipoperoxidação podem ser um reflexo do incremento da atividade da SOD, sendo uma adaptação para manutenção do *status* oxidativo.

A enzima catalase apresentou níveis mais altos de atividade nos meses de inverno nos machos e de verão em ambos os gêneros. A alta atividade em machos durante o inverno pode ter relação com a alta atividade da superóxido dismutase no mesmo período visto que estas enzimas atuam de maneira sequencial. O possível padrão sazonal de formação de peróxido de hidrogênio derivado possivelmente da reação da SOD pode justificar a alta atividade da CAT nesta estação. Entretanto, o mesmo padrão não é observado nas fêmeas, que tem sua atividade mais elevada na mesma estação

(verão) em que os níveis de atividade da superóxido dismutase foram mais baixos, sugerindo que outras enzimas antioxidantes e/ou o sistema não enzimático estejam atuando na manutenção da lipoperoxidação durante o período. Experimentos futuros visando esclarecer tais diferenças devem ser delineados. Tanto em machos como em fêmeas observamos no verão níveis mais elevados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, estando estes aliados a um incremento, como já citado, da atividade da catalase, sugerindo uma tentativa de manter o balanço oxidativo via aumento da atividade enzimática.

A enzima glutathione S-transferase (GST) pertence a uma família de enzimas que têm um papel importante na metabolização de compostos endobióticos e xenobióticos, catalisando a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas (Hermes-Lima 2004;Freitas et al. 2008). Apresentam também, uma função secundária na linha de defesa antioxidante, tendo um importante papel na proteção de danos em membranas celulares originados por peroxidação lipídica (Tu et al. 2008, Romero et al. 2013). As GSTs 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 (Freitas et al. 2008), o que talvez possa explicar os altos níveis de atividade desta enzima encontrados principalmente no período de reprodução mais intensa em ambos os sexos de *H. kaingang*.

Os níveis de atividade da glutathione S-transferase apresentaram, para ambos os sexos, maiores valores no outono, diminuindo na estação seguinte com os mais baixos valores encontrados durante o estudo. Os valores encontrados no outono podem ser reflexos de tentativas de controle da lipoperoxidação, que apresenta paralelamente níveis altos na estação. A enzima pode apresentar um importante papel no controle antioxidante quando outras enzimas apresentam baixa atividade (Sheehan e Power 1999). Essa hipótese é reforçada pelo fato de, no outono, os níveis da superóxido dismutase e catalase estarem baixos em ambos os sexos.

Os níveis de lipoperoxidação mais altos no verão, tanto para machos como para fêmeas podem estar relacionados com o fotoperíodo, isto é aumento do dia e encurtamento da noite da estação. Um estudo com o lagostim-vermelho *Procambarus clarkii* apontou variações em marcadores antioxidantes quando expostos a um longo fotoperíodo ou à alta irradiação (Fanjul-Moles et al. 2003).

Pode-se supor também, que nesta espécie durante os meses de verão e de outono os animais possam intensificar a atividade exploratória do habitat possivelmente a procura de alimento para que possam atingir um estado energético suficiente para a reprodução e passagem dos meses frios. Os altos níveis de lipoperoxidação no outono podem estar refletindo a um aumento dessa atividade exploratória dos animais como também para a busca de um parceiro reprodutivo pelos machos. Fêmeas também podem ter um aumento de atividade em períodos que antecedem a reprodução e formação dos pares. Tal perfil de resposta é corroborado pelo observado no isópodo *Idotea báltica*, onde as fêmeas da espécie resistem fortemente e escapam das tentativas de guarda dos machos (Jormalainen e Merilaita 1993; Jormalainen 1998).

Os níveis mais reduzidos da peroxidação lipídica encontrados no inverno e na primavera podem ser reflexo de uma menor atividade dos animais, ou mesmo uma melhor ação do complexo enzimático responsável pela manutenção do balanço oxidativo. No inverno, período em que foi registrado o nível mais baixo de lipoperoxidação nos machos foram encontrados os maiores níveis de atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase. De forma semelhante, os níveis de lipoperoxidação no grupo das fêmeas tiveram seus menores valores na primavera, onde os níveis de atividade da superóxido dismutase estavam em seu pico.

5. Conclusão

Os resultados obtidos a partir das análises de marcadores do metabolismo energético, bem como das enzimas antioxidantes e dos níveis de peroxidação lipídica apresentam uma nítida variação estacional acompanhada de estratégias diferentes entre machos e fêmeas. Estas estratégias parecem ser fortemente influenciadas por um período reprodutivo prolongado (outono, inverno e primavera), por um pico de atividade reprodutiva nos meses de outono, pelo grau de atividade exploratória dos animais principalmente no verão e outono e, por fatores abióticos como temperatura e fotoperíodo (insolação). O padrão de resposta apresentado no outono sugere que esta estação representa um momento crítico frente à adaptação do animal ao seu ciclo de vida. No entanto, são necessários mais estudos acerca da biologia reprodutiva da espécie, bem como sobre seus hábitos alimentares e ecologia geral. Além disso, devem

ser aprofundados os estudos sobre a fisiologia do animal, como análises de variação circadiana. Os parâmetros estudados podem ser utilizados no futuro em experimentos de biomonitoramento das condições deste animal frente a seu habitat.

6. Agradecimentos

Nós agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida ao aluno de mestrado e ao seu orientador.

Referências

Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA (2010) Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. Rev. Bras. Reprod. Anim. 34:79-85

Baldinger AJ (2004) A new species of *Hyalella* (Crustacea: Amphipoda: Hyalellidae) from Ash Springs, Lincoln County, USA, with a key to the species of the genus in North America and the Caribbean region. Journal of Natural History 38:1087-1096

Barja G (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. Rejuvenation Research 10:215-223

Blanchard G, Druart X, Kestemont P (2005) Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluviatilis* females in relation to hepatic tissues status and gonad maturation. Journal of Fish Biology 66:73-85

Borowsky B (1978) The relationship between tube-sharing and the time of the female's molt in *Microdeutopus gryllotalpa* and *Ampithoe valida* (Crustacea: Amphipoda). Am. Zool. 18:621

Borowsky B (1980) The physiological control of reproduction in *Microdeutopus gryllotalpa* (Crustacea: Amphipoda). I. The effects of exogenous ecdysterone on the female's molt and behavioral cycles. The Journal of Experimental Zoology 213:399-403

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J. 134:707-716

Boyland E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione S transferases in mercapturic acid biosynthesis. Advances in enzymology and related areas of molecular biology 32:173-219

- Brisson D, Vohl MC, St-Pierre J, Hudson TJ, Gaudet D (2001) Glycerol: a neglected variable in metabolic process? *BioEssays* 23:534-542
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipids peroxidation. *Methods Enzymology* 52: 302-310
- Bueno AAP, Bond-Buckup G (2004) Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup and Buckup (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). *Acta Limnol. Bras.* 16(2):115–127
- Bueno AAP, Araujo PB, Cardoso GM, Gomes KM, Bond-Buckup G (2013) Two new species of *Hyaella* (Amphipoda, Dogielinotidae) from Brazil. *Crustaceana* 86:802-819
- Castiglioni DS, Dutra BK, Oliveira GT, Bond-Buckup G (2007) Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 148:204-213
- Chang ES, O'Connor JD (1983) Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss DE (ed) *The Biology of Crustacea. Volume 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Academic Press pp. 263-281
- Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrell AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL (2013) What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv. Physiol.* 1: 1–23
- Dutra BK, Castiglioni DS, Santos RB, Bond-Buckup G, Oliveira GT (2007) Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comparative Biochemistry and Physiology; Part A* 148:239-247
- Dutra BK, Santos RB, Bueno AAP, Oliveira GT (2008) Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyaella curvispina* (Crustacea, amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology; Part A* 151:322–328
- Fanjul-Moles ML, Durán-Lizarraga ME, Gonsenbatt ME, Prieto-Sagredo J (2003) The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*. *Photochemistry and Photobiology* 77:210-218
- Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509
- Freitas DRJ, Vaz Junior IS, Masuda A (2008) Expressão e atividade enzimática de glutatona S-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17:99-104
- Frings C, Dunn R (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53: 89-91

- Gilbert LI, O'Connor JD (1970) Lipid metabolism and transport in arthropods. In: Florkin M, Scheer BT (ed). Chemical Zoology. Volume V: Arthropoda Part A. Academic Press pp.229-251
- Giusto A, Ferrari L (2014) Biochemical responses of ecological importance in males of the austral South America amphipod *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 exposed to waterborne cadmium and copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100:193-200
- Hargrave BT (1970) The effect of a deposit-feeding amphipod on the metabolism of benthic microflora. *Limnology and Oceanography* 15:21–30
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed). Functional metabolism: Regulation and adaptation John Wiley & Sons, Hoboken pp.319-368
- Jormalainen V, Merilaita S (1993) Female resistance and precopulatory guarding in the isopod *Idotea baltica* (Pallas). *Behaviour* 125:219-231
- Jormalainen V (1998) Precopulatory mate guarding in crustaceans: male competitive strategy and intersexual conflict. *The Quarterly Review of Biology* 73:275-304
- Koenig S, Solé M (2012) Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Marine Environmental Research* 79:122-131
- Kruschwitz LG (1978) Environmental factors controlling reproduction of the amphipod *Hyalella Azteca*. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 58:16-21
- Kucharski LCR, da Silva RSM (1991) Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnatus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology* 100A: 599-602
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Emilei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by Adriamycin and 4'-Epiadrimicin in mice. *Tumor* 71:241-249
- McCord JM, Keele Jr BB, Fridovich I (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68:1024-1027
- Morgan-Martins MI (2003) A reposição de estrogênio diminui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Mourente G, Rodríguez A (1991) Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biology* 110:21-28

- Mykles DL (2011) Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 127:196-203
- Negro CI, Castiglioni M, Senkman LE, Loteste A, Collins P (2013) Cost of reproduction. Changes in metabolism and endosulfan lethality caused by reproductive behavior in *Hyaella curvispina* (Crustacea: Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90:121-127
- Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1287-1312
- Oliveira GT, Fernandes FA, Bond-Buckup G, Bueno AA, Silva RSM (2003) Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). *Memoirs of Museum Victoria* 60(1):59-62
- Oliveira GT, Fernandes FA, Bueno AAP, Bond-Buckup G (2007) Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147:600-606
- Paital B, Chainy GBN (2013) Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87: 33-41
- Pilgrim W, Burt MDB (1993) Effect of acute pH depression on the survival of the freshwater amphipod *Hyaella azteca* at variable temperatures: field and laboratory studies. *Hydrobiologia* 254:91-98
- Racotta IS, Ramirez JL, Ibarra AM, Rodríguez-Jaramillo MC, Carreño D, Palacios E (2003) Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lycopecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217:335-349
- Ramamurty PS (1968) Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly, *Panorpa communis*. *J. Insect Physiol.* 14:1325-1330
- Robinson BW, Doyle RW (1985) Trade-off between male reproduction (amplexus) and growth in the amphipod *Gammarus lawrencianus*. *Biol. Bull.* 168:482-488
- Romero MC, Schvezov N, Sotelano MP, Diez MJ, Florentin O, Tapella F, Lovrich G (2013) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in two Lithodes species from South Atlantic during summer. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48:227-234
- Schvezov N, Lovrich GA, Tapella F, Romero MC (2013) Daily variations of the antioxidant defense system of the lithodid crab *Lithodes santolla*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 164:605-611
- Sheehan D, Power A (1999) Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 123:193-199

Sroda S, Cossu-Leguille C (2011) Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83:538-544

Stevenson RD (2006) Ecophysiology and conservation: the contribution of energetics—introduction to the symposium. *Integr Comp Biol* 46:1088–1092

Storey KB (1983) Metabolism and bound water in overwintering insects. *Criobiology* 20:365-379

Strong Jr DR (1973) Amphipod Amplexus: The Significance of Ecotypic Variation. *Ecology* 54:1383-1388

Tracy CR, Flack KM, Zimmerman LC, Espinoza RE, Tracy CR (2005) Herbivory imposes constraints on voluntary hypothermia in lizards. *Copeia* 2005: 12–19

Tu HT, Silvestre F, Bernard A, Douny C, Phuong NT, Tao CT, Maghuin-Rogister G, Kestemont P (2008) Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture* 285:244-248

Van Handel E (1965) Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry* 11:256-265

Wang F, Goulet RR, Chapman PM (2004) Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyalella azteca*: the gap between laboratory and nature. *Chemosphere* 57:1713-1724

Wellborn GA (1994) Size-biased predation and the evolution of prey life histories: a comparative study of freshwater amphipod populations. *Ecology* 75: 2104-2117

Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*. 3rd edn Prentice-Hall London

Apêndices

Tabela 1. Níveis de temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade registrados no tanque nas quatro estações.

	Temperatura da água (°C)	Temperatura do ar (°C)	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH	Condutividade (µS)
Verão	25,8	19,1	4,46	8,4	10,9
Outono	16,3	13,3	3,59	9,8	25,3
Inverno	16,1	12,3	5,4	8,5	18,58
Primavera	19,5	16,6	5,07	6,6	13,7

Tabela 2. Níveis de matéria orgânica, nitrito, nitrato, fósforo total e dureza da água das amostras de água do tanque analisadas nas quatro estações. Todos os parâmetros foram expressos em mg/L.

	Matéria orgânica	Nitrito	Nitrato	Fósforo total	Dureza da água
Verão	0,1	0,1	0,02	0,02	0,1
Outono	0,2	0,11	0,03	0,06	0,9
Inverno	0,2	0,15	0,06	0,11	0,97
Primavera	0,2	0,1	0,09	0,13	0,9

Figura 1. Níveis de proteínas totais e glicogênio em *Hyalella kaingang* durante o ano. As barras representam as médias \pm erro padrão. As barras pretas indicam machos (M) e as brancas, fêmeas (F). As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), onde letras maiúsculas foram usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. O símbolo ‘*’ no topo representa diferença estatística entre machos e fêmeas.

Figura 2. Níveis de lipídios totais, triglicerídeos e glicerol em *Hyalella kaingang* durante o ano. As barras representam as médias \pm erro padrão. As barras pretas indicam machos (M) e as brancas, fêmeas (F). As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), onde letras maiúsculas foram usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. O símbolo ‘*’ no topo representa diferença estatística entre machos e fêmeas.

Figura 3. Níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes em *Hyalella kaingang*. As barras representam as médias \pm erro padrão. As barras pretas indicam machos (M) e as brancas, fêmeas (F). As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), onde letras maiúsculas foram usadas para machos e letras minúsculas para fêmeas. O símbolo ‘*’ no topo representa diferença estatística entre machos e fêmeas.

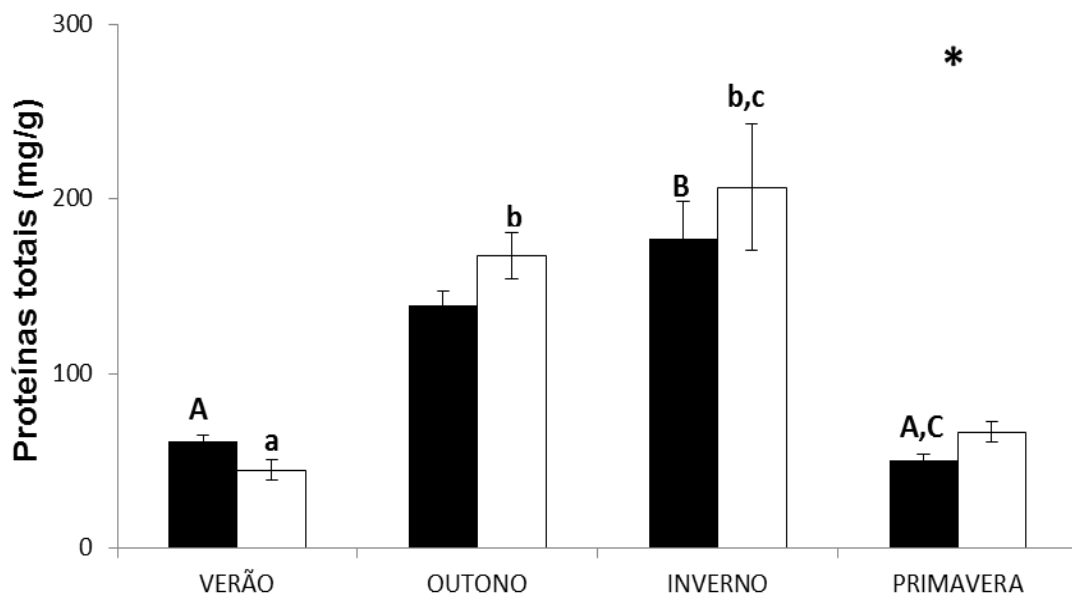
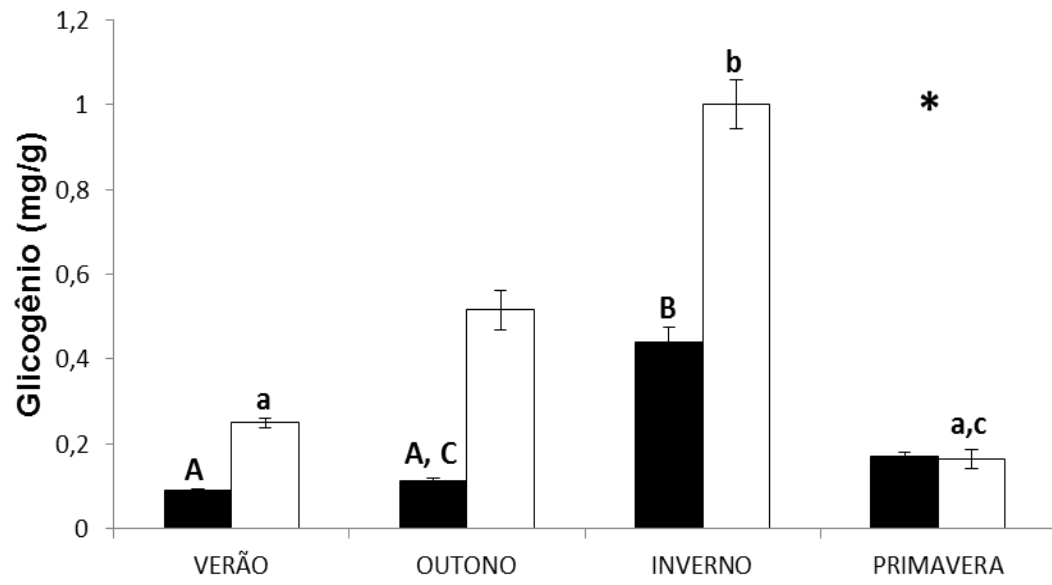


Figura 1

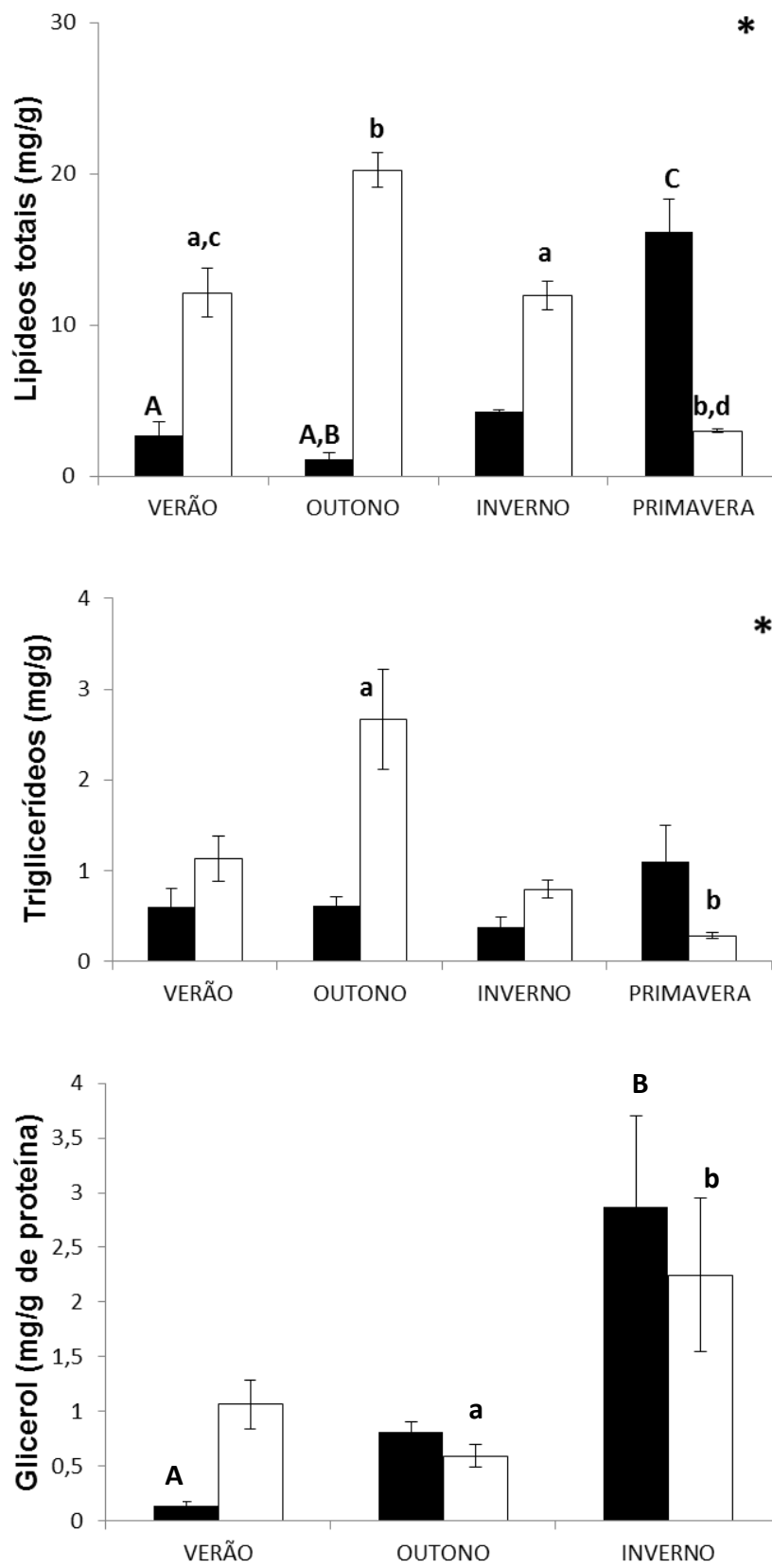


Figura 2

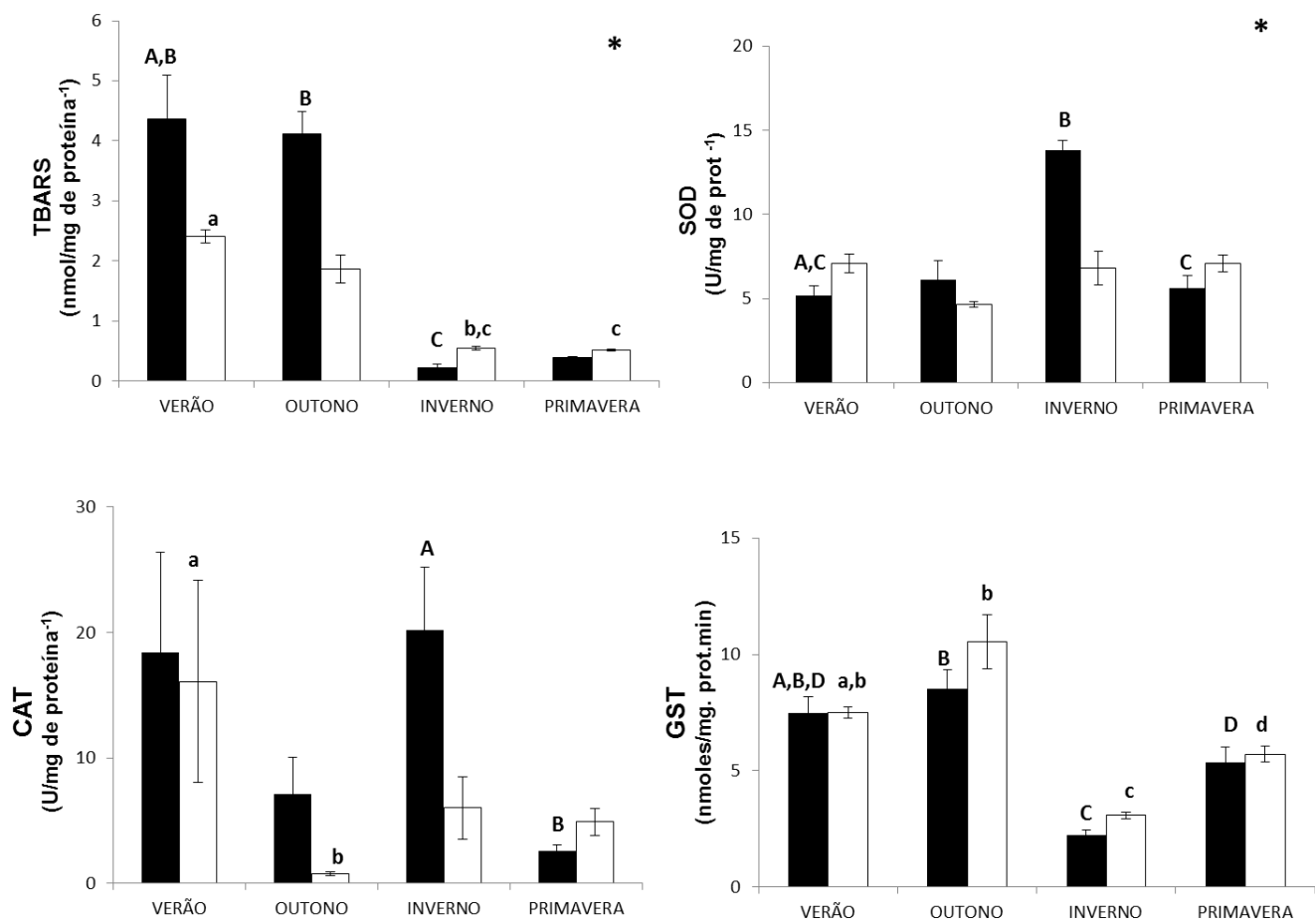


Figura 3

Referências da Dissertação

- Adiyodi RG, Subramoniam, T (1983) Arthropoda- Crustacea. In: Adiyodi, KG, Adiyodi RG. (Eds.) Oogenesis, Oviposition and Oosorption, vol. 1. Wiley, New York, pp 443–495
- Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA (2010) Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. Rev. Bras. Reprod. Anim. 34:79-85
- Baldinger AJ (2004) A new species of *Hyaella* (Crustacea: Amphipoda: Hyaellidae) from Ash Springs, Lincoln County, USA, with a key to the species of the genus in North America and the Caribbean region. Journal of Natural History 38:1087-1096
- Barja G (2007) Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. Rejuvenation Research 10:215-223
- Blanchard G, Druart X, Kestemont P (2005) Lipid content and fatty acid composition of target tissues in wild *Perca fluviatilis* females in relation to hepatic tissues status and gonad maturation. Journal of Fish Biology 66:73-85
- Böcking D, Dauphin-Villemant C, Sedlmeier D, Blais C, Lafont R (1993) Ecdysteroid biosynthesis in moulting glands of the crayfish *Orconectes limosus*: evidence for the synthesis of 3-dehydroecdysone by in vitro synthesis and conversion studies. Insect Biochem. Mol. Biol. 23:57–63.
- Borowsky B (1978) The relationship between tube-sharing and the time of the female's molt in *Microdeutopus gryllotalpa* and *Ampithoe valida* (Crustacea: Amphipoda). Am. Zool. 18:621
- Borowsky B (1980) The physiological control of reproduction in *Microdeutopus gryllotalpa* (Crustacea: Amphipoda). I. The effects of exogenous ecdysterone on the female's molt and behavioral cycles. The Journal of Experimental Zoology 213:399-403
- Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J. 134:707-716
- Boyland E, Chasseaud LF (1969) The role of glutathione and glutathione S transferases in mercapturic acid biosynthesis. Advances in enzymology and related areas of molecular biology 32:173-219
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipids peroxidation. Methods Enzymology 52: 302-310
- Bueno AAP, Bond-Buckup G (2004) Natural diet of *Aegla platensis* Schmitt and *Aegla ligulata* Bond-Buckup and Buckup (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). Acta Limnol. Bras. 16(2):115–127

- Bueno AAP, Araujo PB, Cardoso GM, Gomes KM, Bond-Buckup G (2013) Two new species of *Hyaella* (Amphipoda, Dogielinotidae) from Brazil. *Crustaceana* 86:802-819
- Castiglioni DS, Dutra BK, Oliveira GT, Bond-Buckup G (2007) Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 148:204-213
- Cavaletto JF, Nalepa TF, Dermott R, Gardner S, Quigley MA, Lang GA (1996) Seasonal variation of lipid composition, weight and length in juvenile *Diporeia* spp. (Amphipoda) from lakes Michigan and Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53:2044-2051
- Chang ES, O'Connor JD (1983) Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. In: Bliss DE (ed) *The Biology of Crustacea. Volume 5: Internal Anatomy and Physiological Regulation*. Academic Press pp. 263-281
- Cooke SJ, Sack L, Franklin CE, Farrell AP, Beardall J, Wikelski M, Chown SL (2013) What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv. Physiol.* 1: 1–23
- Dutra BK, Castiglioni DS, Santos RB, Bond-Buckup G, Oliveira GT (2007) Seasonal variations of the energy metabolism of two sympatric species of *Hyaella* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae) in the southern Brazilian highlands. *Comparative Biochemistry and Physiology; Part A* 148:239-247
- Dutra BK, Fernandes FA, Oliveira GT (2008) Carbofuran-induced alterations in biochemical composition, lipoperoxidation, and Na⁺/K⁺-ATPase activity of *Hyaella pleoacuta* and *Hyaella curvispina* in bioassays. *Comparative Biochemistry and Physiology; Part C* 147:179–188
- Dutra BK, Santos RB, Bueno AAP, Oliveira GT (2008) Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyaella curvispina* (Crustacea, amphipoda). *Comparative Biochemistry and Physiology; Part A* 151:322–328
- Dutra BK, Fernandes FA, Failace DM, Oliveira GT (2011) Effect of roundup (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology* 20:255–263
- Fanjul-Moles ML, Durán-Lizarraga ME, Gonsenbatt ME, Prieto-Sagredo J (2003) The effect of photoperiod and light irradiance on the antioxidant circadian system of two species of crayfish from different latitudes: *Procambarus clarkii* and *P. digueti*. *Photochemistry and Photobiology* 77:210-218
- Folch J, Less M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509
- Freitas DRJ, Vaz Junior IS, Masuda A (2008) Expressão e atividade enzimática de glutationa S-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17:99-104

- Frings C, Dunn R (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophosphovanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53: 89-91
- Gering FS, Oliveira LFF, Dutra BK, Oliveira GT (2009) Biochemical composition, lipoperoxidation, Na⁺/K⁺ ATPase activity and reproduction of *Hyalella castroi* (Amphipoda, Dogielinotidae) fed with different diets. *Journal of Experimental Zoology* 311A: 408-421
- Gilbert LI, O'Connor JD (1970) Lipid metabolism and transport in arthropods. In: Florkin M, Scheer BT (ed). *Chemical Zoology. Volume V: Arthropoda Part A*. Academic Press pp.229-251
- Giusto A, Ferrari L (2014) Biochemical responses of ecological importance in males of the austral South America amphipod *Hyalella curvispina* Shoemaker, 1942 exposed to waterborne cadmium and copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100:193-200
- Grieneisen ML (1994) Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24:115–132
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford
- Hargrave BT (1970) The effect of a deposit-feeding amphipod on the metabolism of benthic microflora. *Limnology and Oceanography* 15:21–30
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed). *Functional metabolism: Regulation and adaptation* John Wiley & Sons, Hoboken pp.319-368
- Jormalainen V, Merilaita S (1993) Female resistance and precopulatory guarding in the isopod *Idotea baltica* (Pallas). *Behaviour* 125:219-231
- Jormalainen V (1998) Precopulatory mate guarding in crustaceans: male competitive strategy and intersexual conflict. *The Quarterly Review of Biology* 73:275-304
- Koenig S, Solé M (2012) Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Marine Environmental Research* 79:122-131
- Kruschwitz LG (1978) Environmental factors controlling reproduction of the amphipod *Hyalella Azteca*. *Proc. Okla. Acad. Sci.* 58:16-21
- Kucharski LCR, da Silva RSM (1991) Seasonal variation in the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnatus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology* 100A: 599-602
- Llesuy SF, Milei J, Molina H, Boveris A, Emilei S (1985) Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by Adriamycin and 4'-Epiadrimicin in mice. *Tumor* 71:241-249

- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101:13-30
- McCord JM, Keele Jr BB, Fridovich I (1971) An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: The physiological function of superoxide dismutase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68:1024-1027
- Morgan-Martins MI (2003) A reposição de estrogênio diminui o dano oxidativo, aumenta a atividade das enzimas antioxidantes e melhora a função cardíaca em ratas. Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- Mourente G, Rodríguez A (1991) Variation in the lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Marine Biology* 110:21-28
- Mykles DL (2011) Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 127:196-203
- Negro CI, Castiglioni M, Senkman LE, Loteste A, Collins P (2013) Cost of reproduction. Changes in metabolism and endosulfan lethality caused by reproductive behavior in *Hyaella curvispina* (Crustacea: Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 90:121-127
- Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1287-1312
- O'Connor JD, Gilbert LI (1968) Aspects of lipids in Crustaceans. *Am. Zoologist* 8: 529-539
- Oliveira GT, Fernandes FA, Bond-Buckup G, Bueno AA, Silva RSM (2003) Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). *Memoirs of Museum Victoria* 60(1):59-62
- Oliveira GT, Fernandes FA, Bueno AAP, Bond-Buckup G (2007) Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 147:600-606
- Overbeck GE, Müller SC, Fidelis A, Pfadenhauer J, Pillar VD, Blanco CC, Boldrini II, Both R, Forneck ED (2009) Os campos sulinos: um bioma negligenciado. In: Pillar VD, Müller SC, Castilhos ZMS, Jaques AVA (ed) *Campos sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade*. Brasília Ministério do Meio Ambiente pp 26-41
- Paital B, Chainy GBN (2013) Seasonal variability of antioxidant biomarkers in mud crabs (*Scylla serrata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 87: 33-41
- Pilgrim W, Burt MDB (1993) Effect of acute pH depression on the survival of the freshwater amphipod *Hyaella azteca* at variable temperatures: field and laboratory studies. *Hydrobiologia* 254:91-98
- Quigley MA, Cavaletto JF, Gardner WS (1989) Lipid composition related to size and maturity of the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *J. Great Lakes Res.* 15(4):601-610

- Racotta IS, Ramirez JL, Ibarra AM, Rodríguez-Jaramillo MC, Carreño D, Palacios E (2003) Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lycopecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217:335-349
- Ramamurty PS (1968) Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion fly, *Panorpa communis*. *J. Insect Physiol.* 14:1325-1330
- Robinson BW, Doyle RW (1985) Trade-off between male reproduction (amplexus) and growth in the amphipod *Gammarus lawrencianus*. *Biol. Bull.* 168:482-488
- Romero MC, Schvezov N, Sotelano MP, Diez MJ, Florentin O, Tapella F, Lovrich G (2013) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in two *Lithodes* species from South Atlantic during summer. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 48:227-234
- Schvezov N, Lovrich GA, Tapella F, Romero MC (2013) Daily variations of the antioxidant defense system of the lithodid crab *Lithodes santolla*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 164:605-611
- Sheehan D, Power A (1999) Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 123:193-199
- Sies H (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91: 31–38
- Sroda S, Cossu-Leguille C (2011) Seasonal variability of antioxidant biomarkers and energy reserves in the freshwater gammarid *Gammarus roeseli*. *Chemosphere* 83:538-544
- Stevenson RD (2006) Ecophysiology and conservation: the contribution of energetics—introduction to the symposium. *Integr Comp Biol* 46:1088–1092
- Strong Jr DR (1973) Amphipod Amplexus: The Significance of Ecotypic Variation. *Ecology* 54:1383-1388
- Talbot P, Helluy S (1995) Reproduction and Embryonic Development . In: Jan Robert Factor. *Biology of the Lobster Homarus americanus*. San Diego, CA Academic Press pp 177–212
- Tracy CR, Flack KM, Zimmerman LC, Espinoza RE, Tracy CR (2005) Herbivory imposes constraints on voluntary hypothermia in lizards. *Copeia* 2005: 12–19
- Tu HT, Silvestre F, Bernard A, Douny C, Phuong NT, Tao CT, Maghuin-Rogister G, Kestemont P (2008) Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture* 285:244-248
- Van Handel E (1965) Estimation of glycogen in small amount soft tissue. *Analytical Biochemistry* 11:256-265

Wang F, Goulet RR, Chapman PM (2004) Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyaella azteca*: the gap between laboratory and nature. *Chemosphere* 57:1713-1724

Webster NR, Nunn JP (1988) Molecular structure of free radicals and their importance in biological reactions. *Br. J. Anaesth.* 60:98-108

Wellborn GA (1994) Size-biased predation and the evolution of prey life histories: a comparative study of freshwater amphipod populations. *Ecology* 75: 2104-2117

Wellborn GA (2000) Selection on a sexually dimorphic trait in ecotypes within the *Hyaella azteca* species complex (Amphipoda: Hyalellidae). *American Midland Naturalist* 143: 212-225

Zar JH (1996) *Biostatistical Analysis*. 3edn Prentice-Hall London

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO



JOURNAL OF COMPARATIVE PHYSIOLOGY B

Instructions for Authors

ISSN:1432-136X

DESCRIPTION

The Journal of Comparative Physiology B publishes peer-reviewed original articles and reviews on the comparative physiology of invertebrate and vertebrate animals. Special emphasis is placed on integrative studies that elucidate mechanisms at the whole-animal, organ, tissue, cellular and/or molecular levels. Review papers report on the current state of knowledge in an area of comparative physiology, and directions in which future research is needed.

Aspects of particular interest include: molecular and endocrine control of metabolism; membrane transport and nutrient absorption; respiration and gas exchange; circulation and body fluids; energy and temperature relations; muscle and exercise physiology; energetics and endocrinology of reproduction; evolutionary aspects of physiology, and more.

Related subjects: Animal Sciences - Biochemistry & Biophysics - Biomedical Sciences - Human Physiology

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out.

The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Language

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to ask a native speaker to help you or arrange for your manuscript to be checked by a professional language editor prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

Title Page

- The title page should include:
- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific Style

Units, symbols, abbreviations

SI units and the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) are recommended; except for thermodynamics, the Celsius temperature scale should be used. Abbreviations must be kept to a minimum; ad hoc abbreviations should be avoided. Except for standard physiological and biochemical abbreviations (R.Q., e.p.s.p., STDP, ATP, NAD, EDTA, etc.), all abbreviations must be explained in a footnote on the title page.

Genus and species names should be in italics.

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,
- "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that:

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1