



INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ARTUR ANTUNES NAVARRO VALGAS

LAGOSTIM INVASOR: UMA ABORDAGEM ECOFISIOLÓGICA SOBRE
***Procambarus clarkii* (CRUSTACEA, CAMBARIDAE) NO SUDESTE BRASILEIRO**

PORTO ALEGRE

2018

ARTUR ANTUNES NAVARRO VALGAS

LAGOSTIM INVASOR: UMA ABORDAGEM ECOFISIOLÓGICA SOBRE
***Procambarus clarkii* (CRUSTACEA, CAMBARIDAE) NO SUDESTE BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Biologia e comportamento animal

Orientador (a): Prof. Dr. Paula Beatriz de Araujo

PORTO ALEGRE

2018

ARTUR ANTUNES NAVARRO VALGAS

LAGOSTIM INVASOR: UMA ABORDAGEM ECOFISIOLÓGICA SOBRE
Procambarus clarkii (CRUSTACEA, CAMBARIDAE) NO SUDESTE BRASILEIRO

Aprovada em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Felipe Bezerra Ribeiro

Prof^ª. Dr^ª. Anapaula Sommer Vinagre

Prof^ª. Dr^ª. Flavia Pinheiro Zanotto

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu Avô João Camilo Navarro (*in memoriam*) que ao longo de toda minha vida, foi um exemplo de homem de fibra, justiça, perseverança e alegria, que mesmo com todas as dificuldades que a vida lhe impôs sempre manteve a alegria de viver, contagiando todos a sua volta. Foi um homem que só abria a boca para verdades e lições de vida, sendo sempre muito sábio e dando sempre as palavras certas que você precisava ouvir e que com apenas um abraço era capaz de resolver todas as aflições, mesmo que por um breve momento.

“Siga sempre em frente, que se olhar para trás a porta fecha em você”.

(João Camilo Navarro, 1948-2017).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais Maurien Camila Navarro Valgas e José Antunes Valgas e meu irmão Murilo Antunes Navarro Valgas, por todo o apoio antes e durante a execução deste trabalho. Sendo sempre meus portos seguros, minha força para seguir em frente, meus ombros amigos e motivadores. Durante estes seis anos de formação acadêmica sempre estiveram comigo, vibrando a cada vitória e erguendo minha cabeça a cada tropeço. Sem o apoio de vocês não teria chego até aqui e muito menos executado esse trabalho. Obrigado pela paciência, por terem aguentado passar dois anos de muita saudade, me vendo uma vez a cada três meses e mesmo assim nunca deixando de me apoiar e incentivar. Obrigado por me ajudarem em campo, recolhendo, limpando e transportando armadilhas para cima e para baixo, ficando o final de semana todo sentado em uma mesinha de madeira no parque, esperando eu coletar, medir, pesar e tirar hemolinfa de 60 animais a cada coleta. Sem o amor e apoio de vocês hoje, eu não estaria aqui escrevendo esta dissertação.

A minha orientadora Prof^a Paula Beatriz, de Araujo por ter aceitado entrar nessa empreitada junto comigo, sempre me guiando e auxiliando no desenvolvimento de todo o trabalho. Agradeço por todas as conversas e trocas de experiências, tanto profissionais quanto pessoais. Agradeço a minha Co-orientadora de coração e minha mãe científica Prof^a Guendalina Turcato Oliveira da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), que vem me guiando no meio acadêmico desde que entrei na faculdade de Ciências Biológicas, durante toda minha iniciação científica e agora durante o mestrado, agradeço por todos esses anos de oportunidades, aprendizado, convivência, confiança e incentivo, sendo muitas vezes bem mais que uma orientadora. Agradeço aos professores, Dr. Sergio Bueno na Universidade de

São Paulo (USP) por me auxiliar e emprestar as armadilhas para as coletas, ao Dr. Márcio Borges da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e a Dr^a. Daiana Silva-Castiglioni da Universidade do Vale dos Sinus (UNISINOS) por aceitarem ser minha banca de acompanhamento durante o mestrado e sugestões para a dissertação, a Dr^a. Anapaula Vinagre (UFRGS), Dr. Felipe Ribeiro (UFRGS) e a Dr^a. Flávia Zanotto por aceitarem ser minha banca avaliadora e por todas as dicas e sugestões para a dissertação.

Ao meu companheiro de vida Eduardo Nogueira e amigos Ismael Plentz, Geraldine Louise, Carolina Hoffman, Sarah Santos e Leila Tinoco por toda a paciência nesses anos, ouvindo minhas reclamações e “pirações”, mas sempre ao meu lado para o que der e vier. E em especial agradeço aos alunos de iniciação científica que me acompanharam Natália Wingen, Luíza Petroli e Rodrigo Nizolli, sem eles nada disso teria sido produzido de forma tão divertida e saudável. Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia da Conservação e do Laboratório de Carcinologia, em especial Tiziane Molina, Patrícia Rodrigues, Bruna Dutra, Gabriela Miranda, Diogo Oliveira, Augusto Huber, Amanda Horch, Kimberly Marta, Kelly Martinez, Ricardo Nunes e Tainã Loureiro que sempre estiveram ao meu lado me dando apoio moral, dicas, muitas risadas e momentos memoráveis.

Gostaria de agradecer também, aos meus professores por todo o ensinamento dentro e fora de sala de aula, ao programa de pós-graduação em Biologia Animal pela oportunidade de realização do mestrado, todas as experiências que tive durante esses dois anos e ajuda financeira e a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela estrutura cedida para o desenvolvimento deste trabalho. Assim como agradecer a CAPES pela minha bolsa de mestrado.

Apresentação

A presente dissertação está estruturada em uma “Introdução Geral”, “Objetivos” e “Dois Capítulos” buscando proporcionar uma melhor compreensão da biologia do lagostim invasor *Procambarus clarkii*. A Introdução Geral inclui uma síntese sobre metabolismo intermediário e balanço oxidativo de crustáceos. Em seguida, são apresentados dois capítulos, na forma de artigos científicos. O capítulo I caracteriza aspectos ecofisiológicos do ciclo sazonal de fêmeas de *P. clarkii* e o capítulo II caracteriza as diferenças bioquímico-funcionais de machos reprodutivos e não reprodutivos ao longo do ciclo sazonal. Por fim, as considerações finais, que contêm as principais conclusões dos dois capítulos desenvolvidos nesta dissertação. A dissertação e Capítulo I estão formatados para as regras da “Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology” e o capítulo II está formatado conforme as regras da “Science of The Total Environment”.

Resumo

A perda da biodiversidade ao longo das últimas décadas está relacionada com diversas alterações ambientais, entre elas a introdução de espécies exóticas que geralmente tem um efeito negativo sobre as comunidades e os ecossistemas nativos. *Procambarus clarkii* é uma espécie de lagostim nativo do centro-sul dos Estados Unidos e nordeste do México, considerada invasora em diversos países, onde é responsável por inúmeros problemas ambientais. Organismos aquáticos estão sujeitos a constantes flutuações abióticas e bióticas que influenciam seus processos fisiológicos. O conhecimento e a caracterização das variações metabólicas e fisiológicas dos organismos ao longo das estações do ano são importantes para compreender períodos de suscetibilidade destes organismos. Com isso a presente dissertação tem por objetivo estabelecer e avaliar biomarcadores ligados ao metabolismo intermediário, ao balanço oxidativo, a trato digestório (repleção gástrica e índice hepatossomático) e trato reprodutivo (índice gonadossomático e grau de maturação ovariana) de *P. clarkii* no sudeste brasileiro. Foram realizadas quatro coletas, uma a cada estação do ano, no Parque Alfredo Volpi em São Paulo-SP, durante o ano de 2016. Os animais foram separados por categoria reprodutiva (Machos reprodutivos= M1, Machos não reprodutivos=M2 e Fêmeas), pesados, medidos, tiveram a hemolinfa coletada, foram criotetanasiados e seus tecidos removidos (músculo abdominal, hepatopâncreas e gônadas das fêmeas). O grau de repleção gástrico foi categorizado por prospecção visual e os índices hepato e gonadossomático calculados levando em consideração a massa do órgão em relação à massa total do animal. Foram quantificados na hemolinfa os níveis circulantes de glicose, proteínas totais, ácido úrico, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL. Nos tecidos foram quantificados os níveis de glicogênio, proteínas totais, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol. Além de quantificados parâmetros do balanço oxidativo como a lipoperoxidação e a atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione S-transferase. Os resultados deste estudo evidenciam que esta espécie se reproduz ao longo de todo ano com maior intensidade no verão. Os marcadores fisiológicos evidenciam um grande investimento reprodutivo principalmente nas fêmeas, observou-se o uso de substratos energéticos para a reprodução, conduzindo possivelmente a um incremento do dano oxidativo (lipoperoxidação) na estação reprodutiva. Os M1 e M2 apresentam distinções relacionadas às funções de reprodução e crescimento, com alocação de substratos energéticos em M1 para reprodução e em M2 para ser usado possivelmente, no processo de muda e anabolismo para se tornar um M1. Nota-se a diminuição da atividade alimentar em M2 após o período reprodutivo, possivelmente relacionado a uma baixa capacidade de competição deste com M1. Esses resultados podem auxiliar na tomada de decisão em trabalhos que visem o controle da expansão de *P. clarkii*.

Palavras-chaves: balanço oxidativo: metabolismo: reprodução: Crustacea: fisiologia.

Abstract

The loss of biodiversity over the last few decades is related to a number of environmental changes, including the introduction of exotic species that generally have a negative effect on communities and native ecosystems. *Procambarus clarkii* is a species of crayfish native to the south-central United States and northeastern Mexico, and is considered invasive in several countries, where it is responsible for numerous environmental problems. Aquatic organisms are subject to constant abiotic and biotic fluctuations that influence their physiological processes. The knowledge and characterization of the metabolic and physiological variations of the organisms throughout the seasons are important to an understanding periods of susceptibility of these organisms. The aim of this dissertation was to establish and evaluate biomarkers linked to the intermediate metabolism, oxidative balance, digestive tract (gastric repletion and hepatosomatic index) and reproductive tract (gonadosomatic index and degree of ovarian maturation) of *P. clarkii* in southeastern Brazil. Four collections, one at each season of the year, were carried out in the Alfredo Volpi Park in São Paulo, SP, during the year 2016. The animals were separated by reproductive category (Reproductive Males = M1, Non-reproductive Males = M2 and Females), weighted, measured, had hemolymph collected, were submitted to cryoanesthesia and their tissues were removed (abdominal muscle, hepatopancreas and female gonads). The degree of gastric repletion was categorized by visual survey and the hepato and gonadosomatic indices were calculated by taking into account the mass of the organ in relation to the total mass of the animal. Circulating levels of glucose, total proteins, uric acid, total lipids, triglycerides, total cholesterol and VLDL cholesterol were quantified in the hemolymph. In the tissues the levels of glycogen, total proteins, total lipids, triglycerides and cholesterol were quantified. In addition, the oxidative balance was quantified through parameters such as lipoperoxidation and the activity of the enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione S-transferase. The results of this study show that this species reproduces throughout the year with greater intensity in the summer. The physiological markers evidenced a higher reproductive investment mainly in females, where we observed the use of energetic substrates for reproduction, possibly leading to an increase of oxidative damage (lipoperoxidation) in the reproductive season. M1 and M2 present distinctions related to reproduction and growth functions, with allocation of energetic substrates in M1 for reproduction and in M2 possibly for the process of moulting and anabolism to become an M1. The decrease in M2 activity after the reproductive period is possibly related to a low capacity of competition with M1. These results may help in the decision making of future research aimed at controlling the expansion of *P. clarkii*.

Keywords: oxidative balance: metabolism: reproduction: crustacean: physiology.

Sumário

Introdução Geral.....	11
Objetivos	23
Referências.....	25
<i>Capítulo I: Variações bioquímico-funcionais de fêmeas de <i>Procambarus clarkii</i> (Girard, 1852) (Crustacea, Cambaridae) ao longo de um ciclo sazonal no sudeste brasileiro</i>	<i>36</i>
<i>Capítulo II: Aspectos ecofisiológicos de machos reprodutivos e não reprodutivos de <i>Procambarus clarkii</i> (Girard,1852)</i>	<i>68</i>
Material suplementar.....	109
Considerações Finais.....	110

Introdução Geral

A perda da biodiversidade ao longo das últimas décadas tem se relacionado com diversos distúrbios ambientais, como: mudanças climáticas: uso de agroquímicos: fragmentação, alteração e destruição de habitat: sobre-exploração de recursos naturais e introdução de espécies exóticas (Chapin et al. 2000: Smith et al. 2014). Estes distúrbios ambientais podem afetar os organismos em diferentes níveis de sua organização biológica, alterando a expressão de genes, a transcrição de proteínas, a atividade de enzimas, a produção e a ação de hormônios: conduzindo assim, a perda de funções fisiológicas, a mudanças comportamentais que podem levar a alterações nas relações intraespecíficas e interespecíficas (Lushchak 2011).

Desde os tempos pré-históricos a humanidade carregou e disseminou diversos organismos, tanto animais quanto vegetais, para áreas diferentes das de ocorrência original das espécies (Duarte 2005). Com o avanço das tecnologias de meio de transporte e a globalização houve um aumento da translocação de espécies de um continente a outro com intuito de uso como animal de estimação, decorativo, alimentar, medicinal, entre outros. Muitos destes espécimes acabam sendo introduzidos em ambientes fora de sua área de distribuição natural (Sala et al. 2000).

A introdução de espécies exóticas geralmente tem um efeito negativo sobre as comunidades e ecossistemas nativos. Isto é o que ocorre quando a espécie se torna invasora, gerando uma forte dominância sobre espécies nativas, predando-as, competindo por recursos e se reproduzindo em taxas superiores a dos equivalentes ecológicos, o que pode contribuir para a extinção de espécies nativas (Weis 2010). A invasão biológica combinada com a extinção de espécies nativas pode vir a causar um efeito denominado homogeneização da biodiversidade com fauna e flora de continentes

distintos compostas pelas mesmas espécies (McKinney and Lockwood 1999).

Os ambientes límnicos são especialmente suscetíveis à introdução de espécies invasoras. Isso se deve ao uso destes ambientes pelo homem para aquicultura, lazer e pesca (Gherardi 2006). O Brasil possui uma grande abundância de corpos hídricos que abrigam uma vasta diversidade de peixes, anfíbios e crustáceos (Buckup et al. 2007: ICMBio 2016: Pinheiro and Boss 2016). Dentre os crustáceos, Aeglidae e Parastacidae são táxons presentes em rios, lagos, riachos e zonas alagados da América do Sul (Santos et al.2017: Ribeiro et al. 2016,2017), podendo a introdução de espécies exóticas causar impacto significativo a populações autóctones.

Os lagostins de água doce é um táxon que possui aproximadamente cerca de 669 espécies, com distribuição natural em todos os continentes, exceto na Antártica e porção continental da África (Crandall and De Grave 2017: Toon et al.2010). Estas espécies estão reunidas na infraordem Astacidea, na superfamília Parastacoidea, representada por Parastacidae, com espécies na Austrália, Tasmânia, Nova Zelândia, Madagascar e América do Sul, e na superfamília Astacoidea representada por Astacidae, Cambaridae e Cambaroididae com ocorrência no hemisfério norte (Crandall and De Grave 2017).

Os lagostins exóticos têm uma alta capacidade de dispersão pelos ambientes naturais, o que facilita sua dissipação nos ecossistemas invadidos (Gherardi 2006). A liberação de lagostins exóticos em ambiente natural tem causado o declínio de diversas espécies nativas, incluindo lagostins autóctones (Gil-Sánchez and Alba-Tercedor 2002). Este é o caso do lagostim vermelho da família Cambaridae, *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (Fig.1), nativo do centro-sul dos Estados Unidos e nordeste do México, responsável pela redução das populações nativas de *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758) e

Austropotamobius pallipes (Lereboullet, 1858) na Europa (Gherardi 2006: Gil-Sanchez and Alba-Tecedor 2002).



Figura 1. *Procambarus clarkii*, coletado no Parque Estadual Alfredo Volpi- São Paulo - SP.

Procambarus clarkii é considerada uma espécie invasora em diversos países (Fig.2), onde é responsável por inúmeros problemas ambientais e econômicos, danificando plantios de arroz, áreas de recreação humana, diques em lagos e rios, desestabiliza bancos de areia e margens (Fonseca et al. 1997). Indiretamente, ao cavar seus túneis, eles afetam a turbidez da água reduzindo a penetração de luz e prejudicando o metabolismo de plantas e algas aquáticas (Feminella and Resh 1989).

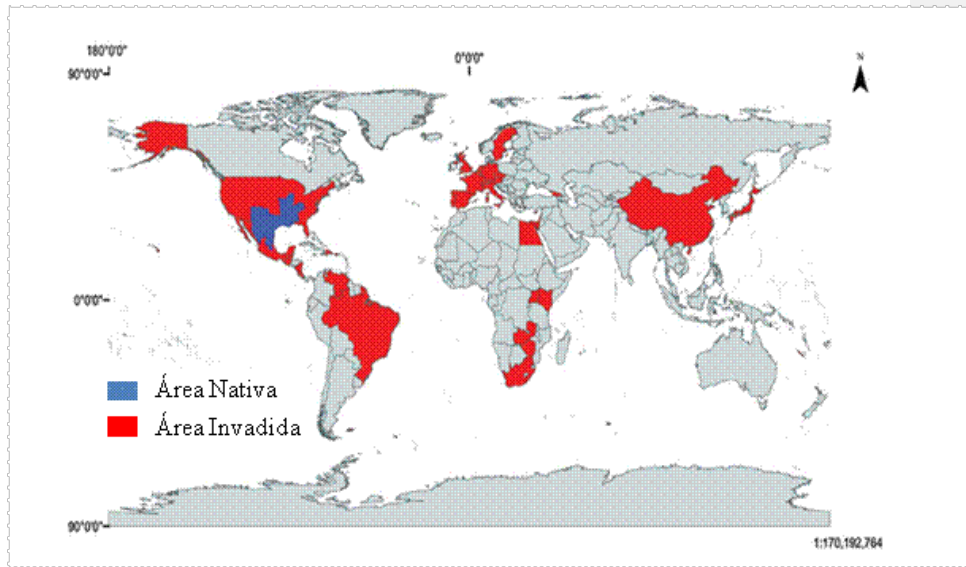


Figura 2. Ocorrência de *Procambarus clarkii* no mundo. Em azul área natural de ocorrência da espécie e em vermelho área onde a espécie foi introduzida. (Modificado de Loureiro et al. 2015).

Procambarus clarkii é uma espécie com claro dimorfismo sexual, com machos, apresentam os dois primeiros pares de pleópodes bem desenvolvidos, adaptados como órgãos copuladores e pereiópodos com ganchos copuladores durante a fase reprodutora: já as fêmeas, apresentam o primeiro par de pleópodo vestigial e apresentam uma estrutura de armazenamento de espermatóforo denominada *annulus ventralis* (Daniels et al. 1994). Os machos adultos apresentam dois morfotipos, um reprodutivo (M1) e outro não reprodutivo (M2), ambos presentes na população ao longo do ano, com o indivíduo podendo alternar entre as dois tipos ao longo do seu ciclo de vida (Taketomi et al. 1990). É uma espécie que possui altas taxas reprodutivas e de fecundidade (cerca de 600 ovos viáveis). Os embriões apresentam desenvolvimento rápido, com eclosão de juvenis de duas a três semanas após a exteriorização dos ovos. Este rápido padrão de

crescimento que lhes permite atingir a maturidade sexual entre três a cinco meses de idade (Momot 1995; Suko 1956). Este padrão é diferente do que é visto em espécies nativas de *Parastacus* (Huxley, 1879), cuja maturidade sexual é atingida somente por volta de 2 a 3 anos de idade, com a fecundidade variando entre 30 a 46 ovos (Fontoura and Buckup 1989; Noro and Buckup 2008).

Procambarus clarkii tem alta plasticidade fisiológica conseguindo adaptar-se a ambientes diversos com tolerância a baixas concentrações de oxigênio, variações de salinidade e acidez, assim como a períodos de seca (Bissattini et al. 2015; Huner and Bar 1984; Zanotto and Wheatly 1993). *Procambarus clarkii* alimenta-se de detritos microbianos, macroinvertebrados bentônicos e planctônicos, algas, plantas suculentas, peixes e larvas de anfíbios desta forma esta espécie pode ser classificada como onívora detritívora (Barbaresi and Gherardi 2000). Em estudo recente, Dalosto et al. (2015) demonstraram que *P. clarkii*, em condições laboratoriais, é mais agressivo que *Parastacus brasiliensis* (von Martens, 1869) e na disputa por alimento é sempre vencedor. Como sugerido pelos autores, tais características podem agregar problemas para a conservação de lagostins nativos.

Por *P. clarkii* possuir uma natureza agressiva, hábito alimentar voraz e generalista, alta taxa reprodutiva e vetores do Oomycete *Aphanomyces astaci* (Schikora 1906), que se mostra letal a muitos crustáceos decápodes, *P. clarkii* tem sido considerado um dos fatores responsáveis pelo declínio de diversas espécies de crustáceos pelo mundo (Gutierrez-Yurrita et al. 1998; Peiró et al 2016).

Para avaliar as condições de saúde e caracterizar o padrão de adaptação de organismos vivos frente a variações sazonais, se faz necessário o estabelecimento de biomarcadores, principalmente aqueles ligados a aspectos bioquímicos, fisiológicos e

imunológicos (Silva-Castiglioni et al. 2012; Wikelski and Cooke 2006). Alguns estudos mostram que marcadores ligados ao metabolismo intermediário e ao balanço oxidativo evidenciam o estado de saúde dos organismos (Beaulieu and Costantini 2014; Costantini 2014; Hau et al. 2015). Deste modo, sendo importantes para o entendimento da dinâmica do ciclo de vida dos animais em ambiente natural e também, como uma ferramenta de predição para habitats com diferente grau de perturbação não natural.

Em crustáceos, a glicose é o principal monossacarídeo circulante na hemolinfa, provinda tanto do trato digestório, através da digestão e absorção de componentes da dieta, como da liberação deste monossacarídeo de diferentes órgãos/tecidos, através da glicogenólise e/ou gliconeogênese (Oliveira and Da Silva 1997; Silva-Castiglioni et al. 2016). A glicose excedente na hemolinfa é captada pelos tecidos, sendo usada para a síntese de mucopolissacarídeos, quitina, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, glicogênio e piruvato (Jimenez and Kinsey 2015). Contudo, se há uma diminuição da glicose circulante, mecanismos compensatórios são ativados podendo conduzir a um incremento da (1) glicogenólise, quebra dos estoques teciduais de glicogênio, e/ou da (2) gliconeogênese, síntese de glicose a partir de compostos não carboidráticos, liberando assim, glicose para a hemolinfa (Oliveira and Da Silva, 1997; Vinagre and Chung 2016). A mobilização de glicose na hemolinfa está intimamente associada a variações bióticas e abióticas como o processo de muda, alimentação, reprodução, sazonalidade, salinidade, oxigênio dissolvido e a alterações ambientais (Jimenez and Kinsey 2015; Pinheiro and Oliveira 2016).

Os lipídeos desempenham um papel importante no metabolismo energético, sendo também constituintes importantes das membranas celulares de diferentes organismos (Jimenez and Kinsey 2015). A principal forma circulante de lipídeos na hemolinfa de crustáceos decápodes são os fosfolipídeos, apesar de encontrarmos

também, triglicerídeos, ésteres de colesterol e ácidos graxos. Os lipídeos são transportadas na hemolinfa principalmente sob a forma de lipoproteínas (HDL, LDL, IDL, VLDL e quilomicras) tendo uma fração (ácidos graxos livres) ligada à albumina e uma fração diminuta livre no plasma (Yepiz-Plascencia et al. 2000, 2002). Dentre as lipoproteínas de transporte as que apresentam maior conteúdo de triglicerídeos são as quilomicras seguidas das VLDLs. Parte dos lipídeos absorvidos na dieta é estocada na forma de triglicerídeos sendo o hepatopâncreas o principal local de estocagem destas moléculas (Chang and O'Connor 1983; Garcia et al. 2002). Estudo desenvolvido por Vinagre and Da Silva (1993) demonstrou que até 20% da massa do hepatopâncreas do caranguejo *Neohelice granulata* (Dana, 1851) é constituída por gordura. Os triglicerídeos são sintetizados a partir da acetil-CoA que é proveniente da oxidação do piruvato e do catabolismo dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos nas mitocôndrias (Chang and O'Connor 1983; Nelson et al. 2014). Existem duas vantagens significativas de estocar triglicerídeos: (1) os átomos de carbono dos ácidos graxos são mais reduzidos do que os dos açúcares, e a oxidação de um grama de triglicerídeos libera mais do que o dobro de energia do que a oxidação de um grama de carboidratos: (2) como os triglicerídeos são hidrofóbicos, o organismo pode estocá-los de forma anidra sem carregar um peso extra com a presença da água, como verificado para a estocagem dos carboidratos (glicogênio: 2g de água por grama de polissacarídeo) (Nelson et al. 2014). As reservas de triglicerídeos são mobilizadas intensamente durante períodos de alta demanda energética, como aqueles ligados a reprodução, muda e jejum (Jimenez and Kinsey 2015).

Os aminoácidos são encontrados na forma livre ou em proteínas. Em crustáceos, há 10 aminoácidos essenciais sendo nove deles iguais aos de humanos, sendo a arginina considerada essencial, enquanto os demais são sintetizados a partir de intermediários da

glicólise e ciclo do ácido cítrico (Claybrook et al. 1983). Na glicólise o 3-fosfoglicerato e o piruvato são precursores de aminoácidos, enquanto no ciclo do ácido cítrico o α -ketoglutarato e o oxaloacetato são substratos para a síntese de aminoácidos (Claybrook et al. 1983). A quebra de proteínas fornece aminoácidos que são utilizados para a síntese de ATP, glicose e gorduras, semelhante ao observado em vertebrados. Os aminoácidos gliconeogênicos são convertidos a piruvato e os ketogênicos são convertidos pelos intermediários do ciclo do ácido cítrico a acetil-CoA ou acetoacetil-CoA, facilitando a oxidação para produção de ATP ou conversão à glicose ou ácidos graxos (Nelson et al. 2014). O nitrogênio dos aminoácidos é excretado na forma de amônia, ácido úrico ou ureia, embora não haja ciclo da ureia verdadeiro em crustáceos, sendo a amônia a forma predominante em crustáceos aquáticos (Claybrook et al. 1983; Jimenez and Kinsey 2015; Nelson et al. 2014).

O hepatopâncreas e o músculo apresentam os maiores estoques de glicogênio, enquanto as brânquias e gônadas os menores, sendo a reserva das gônadas maior ou menor dependendo do ciclo de maturação gonadal (Antunes et al. 2010; Chang and O'Connor 1983; Oliveira and Da Silva 1997). Cabe ressaltar, que o hepatopâncreas é o principal órgão de síntese/estocagem de glicogênio, lipídeos e lipoproteínas (Jimenez and Kinsey 2015). Com a inexistência de um tecido adiposo nestes animais, o hepatopâncreas é o principal sítio de armazenamento de lipídeos e o músculo, por sua vez, é o principal local de armazenamento de fosfolipídeos, colesterol e proteínas (Chang and O'Connor 1983; Silva-Castiglione et al. 2012). Embora similares com os vertebrados à capacidade de armazenamento e a presença destas rotas metabólicas são diferentemente distribuídas nos órgãos/tecidos, onde a gliconeogênese pode ocorrer no hepatopâncreas, brânquias, músculo e hemócitos. Tais peculiaridades estão principalmente associadas à presença de um sistema circulatório do tipo aberto que

determina uma distribuição menos efetiva principalmente, de glicose aos diferentes órgãos do animal (Jimenez and Kinsey 2015).

Durante os processos de oxidação, redução e hidrólise das reservas energéticas, podem ser formados subprodutos do oxigênio com propriedades oxidativas, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (EROs) (Beaulieu and Costantini 2014, Dzal et al. 2015). As mitocôndrias e os peróxissomas são os principais sítios de produção de EROs (Blier et al. 2001), podendo estas serem utilizadas por células imunológicas no combate de patógenos e reações autoimunes, além de utilizadas na oxidação de agentes químicos exógenos ao organismo (Apel and Hirt et al. 2004). A produção de EROs é uma importante resposta bioquímica fisiológica para animais aquáticos expostos a diferentes estressores ambientais (Lesser et al. 2006). Quando os níveis de EROs apresentam-se elevados podem também causar danos em macromoléculas como as proteínas, os lipídeos, os carboidratos e os ácidos nucleicos (Gil-del Valle et al. 1999; Martínez-Cayuela 1999): podendo gerar disfunções metabólicas, danos teciduais, apoptose e morte (Halliwell and Gutteridge 1999).

As espécies reativas de oxigênio incluem (Smith et al. 2014): (1) anion radical superóxido, que é gerado continuamente por diversos processos celulares (transporte de elétrons na mitocôndria, no microsomo e pelas enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase); (2) peróxido de hidrogênio, que é formado pela dismutação do radical superóxido; e (3) o radical hidroxil, que é a mais reativa e lesiva das EROs, não havendo mecanismos de metabolização conhecidos (Dantzer et al. 2014; Gil-del Valle et al. 1999; Vasconcelos et al. 2007).

A atmosfera primordial do Planeta Terra no período Proterozóico era composta principalmente por grandes quantidades de metano, amônia e hidrogênio e uma baixa

concentração de oxigênio. Essa atmosfera foi o ambiente adequado para o surgimento de procariotos anaeróbicos que utilizavam essas moléculas como substrato energético para produção de adenosina trifosfato (ATP), porém essas vias metabólicas levaram a formação e aumento da concentração de dióxido de carbono (CO₂) (Costantini 2014). Com o aumento dos níveis de CO₂ na atmosfera surgiram organismos com a capacidade de realizar fotossíntese e utilizar esta molécula para a produção de energia. Contudo, as vias metabólicas fotossintéticas levam a formação de O₂ como subproduto da fotossíntese, levando ao aumento das concentrações de O₂ na atmosfera (Costantini, 2014). O aumento das concentrações de O₂ levou ao surgimento de vias aeróbias (Falkowski 2006), onde o oxigênio molecular por possuir a característica deceptor de elétrons permitiu ser utilizado em vias mitocondriais de fosforilação oxidativas, aumentando a síntese de ATP (Costantini 2014; Lesser et al. 2006).

Os organismos aeróbios desenvolveram um sistema antioxidante para o controle da produção de EROs. Esse sistema é constituído por um componente enzimático e outro não enzimático, responsáveis pela prevenção e neutralização dos danos gerados pelas EROs (Gil-del Valle. et al., 1999; Lesser et al. 2006; Schlenk and Di Giulio 2002). Dentre as enzimas antioxidantes estudadas que atuam sobre as EROs encontram-se: (1) superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido a peróxido de hidrogênio e água: (2) catalase (CAT) que decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular: (3) glutathione peroxidase (GPx), que atua sobre os peróxidos orgânicos e inorgânicos de forma geral (Barreiros et al. 2006).

Além do sistema antioxidante, destaca-se o sistema de biotransformação que age prevenindo a formação de EROs, atuando sobre moléculas endo e xenobióticas através de enzimas de fase I e II a fim de torná-las mais polares, aumentarem seu peso

molecular e tamanho, facilitando a sua excreção. A família das glutionas S-transferases (GST) atua conjugando moléculas de glutiona a substratos endógenos ou exógenos tornando-as mais facilmente excretáveis, diminuindo seu tempo de permanência no organismo e conseqüentemente sua toxicidade (Dantzer et al. 2014; Richardson et al. 2010). Esta família multifuncional de enzimas desempenha diversos papéis fisiológicos tais como, o sequestro e o transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteroides, hemebilirubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (de Freitas et al. 2008).

A reprodução é um processo fisiológicos de grande investimento energético, sendo seu custo diretamente associado à produção de gametas ou indiretamente com comportamentos desde a corte até o cuidado parental (Berglund and Rosenqvist 1986; Guadagnoli et al. 2005; Teshima et al. 1986). A energia dispendida associada com a reprodução em fêmeas de decápodes reflete normalmente, em um aumento da demanda energética, do consumo de oxigênio, da ingesta alimentar, da suscetibilidade a predadores, além de uma diminuição do crescimento (Berglund and Rosenqvist 1986; Guadagnoli et al. 2005; Teshima et al. 1986). Os lipídeos e proteínas parecem ser os principais metabólitos de reserva mobilizados durante a reprodução, enquanto o glicogênio é mais importante para as atividades físicas do indivíduo (Antunes et al. 2010; Rosa and Nunes 2003). Diversos estudos demonstram que existem três fontes de alocação de metabólitos para a vitelogenese: (1) o hepatopâncreas que é uma importante fonte de lipídeos para as gônadas; (2) o trato gastrointestinal colabora com a digestão/absorção de componentes graxos da dieta; (3) o músculo é um importante sítio de fonte de colesterol para a maturação gonadal. Cabe ressaltar também, uma possível capacidade de síntese de gorduras na própria estrutura gonádica (Girish et al. 2014; Jimenez and Kinsey 2015; Pinheiro 2014; Silva-Castiglioni et al. 2016). A síntese de

diversas proteínas, incluindo enzimas e proteínas da gema do ovo, é importante na maturação gonadal e, conseqüentemente na reprodução. Tais processos levam à formação da vitelogenina, uma glicolipoproteína rica em lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Beaulieu and Costantini 2014; Jimenez and Kinsey 2015).

As estações do ano apresentam uma flutuabilidade de variáveis abióticas (p. ex. temperatura, luminosidade, salinidade, taxa de oxigênio, entre outros) e bióticas (p.ex. tipo e oferta de alimento, etapa do ciclo de vida, presença/ausência de predadores e competidores, entre outros) fundamentais para a determinação de um perfil de respostas bioquímico-funcionais dos organismos ao meio, conduzindo assim, a um processo de adaptação fisiológica (Buckup et al. 2008; Huryñ et al. 2014; Oliveira et al. 2007, Silva-Castiglioni et al. 2007, 2012). Organismos aquáticos estão sujeitos a constantes flutuações nessas variáveis, além daquelas impostas pelo ser humano (Costantini 2014; Reid and Wood 1996). Estudos e a caracterizações das variações metabólicas e fisiológicas dos organismos ao longo das estações do ano, são relevantes para indicar como os animais reagem frente às flutuações ambientais, permitindo uma melhor compreensão de sua sobrevivência em períodos de maior suscetibilidade a agentes estressores (Braghirolli et al. 2016; Koenig and Solé 2012; Silva-Castiglioni et al. 2012).

Objetivos

Objetivo Geral

- ✓ Analisar frente às variações sazonais aspectos do metabolismo intermediário, do balanço oxidativo, da reprodução e da função digestória em uma população de *Procambarus clarkii* presente no sudeste do Brasil: a fim de estabelecer marcadores fisiológicos e temporais de suscetibilidade que possam ser utilizados para minimizar e controlar a invasão do ambiente limnico brasileiro por este lagostim.

Objetivos Específicos

Capítulo I

- ✓ Estabelecer o grau de repleção gástrico: os índices gonadossomático e hepatossomático: além da maturação gonadal:
- ✓ Quantificar marcadores do metabolismo intermediário na hemolinfa (glicose, proteínas, ácido úrico, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL), no hepatopâncreas, no músculo abdominal e nas gônadas (glicogênio, proteínas totais, lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total):
- ✓ Quantificar marcadores do *status* oxidativo em diferentes órgãos/tecidos (hepatopâncreas, músculo abdominal e gônadas) através da determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaiona S-transferase (GST) além da quantificação da intensidade de lipoperoxidação em fêmeas adultas.

- ✓ Estabelecer o grau de repleção gástrico e o índice hepatossomático:
- ✓ Quantificar marcadores do metabolismo intermediário na hemolinfa (glicose, proteínas, ácido úrico, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL), no hepatopâncreas e no músculo abdominal (glicogênio, proteínas totais, lipídeos totais, triglicerídeos e colesterol total):
- ✓ Quantificar marcadores do *status* oxidativo em diferentes órgãos/tecidos (hepatopâncreas e músculo abdominal) através da determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaiona S-transferase (GST) além da quantificação da intensidade de lipoperoxidação em machos reprodutivos e não reprodutivos de *P. clarkii*.

Referências

- Antunes GF, Nunes do Amaral AP, Ribarcki FP, Wiilland EF, Zancan DM, Vinagre AS (2010). Seasonal variations in the biochemical composition and reproductive cycle of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 313:280-291.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-99
- Barbaresi S, Gherardi F (2000) The invasion of the alien crayfish *Procambarus clarkia* in Europe, with particular reference Italy. *Biological Invasions* 2:259-264
- Barreiros ALBS, David JM, David JPDL (2006) Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova* 29:113-123
- Beaulieu M, Costantini D (2014) Biomarkers of oxidative status : missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology*. 2:1-16.
- Beckman KB, Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *Journal of Biological Chemistry* 272: 19633-19636.
- Berglund A, Rosenqvist G (1986) Reproductive costs in the prawn *Palaemon adspersus*: effects on growth and predator vulnerability. *Oikos* 46:349-354.
- Bissattini AM, Traversetti L, Bellavia G, Scalici M. (2015). Tolerance of increasing water salinity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Journal of Crustacean Biology* 35:682-685.
- Blier PU, Dufresne F, Burton RS (2001) Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: Evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends in*

- Genetics 17:400-6.
- Bond-Buckup G. (2003) Família Aeglidae . In: Melo, GA..S Manual de Identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil, São Paulo,Ed.Loyola 21-116.
- Braghirolli FM., Oliveira MR., Turcato GT. (2016). Seasonal variability of metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyaella kaingang* (Crustacea , Amphipoda). Ecotoxicology and Environmental Safety 130: 177-184.
- Buckup PA, Menezes NA, Ghazzi MSA (2007) Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil (Vol. 1). Rio de Janeiro: Museu Nacional.
- Buckup L, Dutra BK, Ribarcki FP, Fernandes FA, Noro CK, Oliveira GT, Vinagre AS (2008) Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology 149:59-67.
- Buckup L (1999) Família Parastacidae. In: L.Buckup and G. Bond-Buckup (eds). Os Crustáceos do Rio Grande do Sul. Ed. Universidade UFRGS, Porto Alegre 319-327
- Chang ES, O'Connor JD (1983) Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. Pages 263-289 in L.H. Mantel, editor. The biology of Crustacea Vol. 5. Academic Press, New York.
- Chapin iii FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Mack MC (2000) Consequences of changing biodiversity. Nature 405:234-242.
- Claybrook DL (1983) Nitrogen metabolism. Pages 163-202 in Mantel, L.H., editor. The biology of Crustacea. Internal anatomy and physiological

- regulation, Vol. 5. Academic Press, New York.
- Crandall KA, De Grave S (2017) An updated classification of the freshwater crayfishes (Decapoda: Astacidea) of the world, with a complete species list. *Journal of Crustacean Biology* 37:615-653.
- Costantini D (2014) Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology. Berlin and Heidelberg 1-38.
- Dalosto MM, Palaoro AV, Souty-Grosset C, Bueno SLS, Loureiro TG, Almerão MP, Araujo PB, Santos S (2015) One step ahead of the enemy: investigating aggressive interactions between invasive and native crayfish before the contact in nature. *Biological Invasions* 17:3503-3515.
- Daniels WH, D'Abramo LR., Graves KF (1994) Ovarian development of female red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) as influenced by temperature and photoperiod. *Journal of Crustacean Biology* 14:530-537.
- Dantzer B, Fletcher Q, Boonstra R, Sheriff M (2014) Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? *Conservation Physiology* 2:1-18
- De Freitas DR, Vaz Junior IDS, Masuda A (2008) Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 17:99-104.
- Duarte RH (2005) História and natureza. Autêntica. Belo Horizonte
- Dzal Y, Jenkin SEM, Lague SL, Reichert MN, York JM, Pamenter ME (2015) Oxygen in demand: How oxygen has shaped vertebrate physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 186:4-26.
- Falkowski PG (2006) Tracing oxygen's imprint on Earth's metabolic evolution.

- Science 311:1724-1725.
- Fanjul-Moles ML, Gonsebatt ME (2011) Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycles. *Oxidative stress in aquatic ecosystems*, 208-223.
- Feminella JW, Resh VH (1989) Submerged macrophytes and grazing crayfish: an experimental study of herbivory in a California freshwater marsh. *Holarctic Ecology* 12:1-18.
- Fonseca JC, Marques JC, Madeira VMC (1997) Oxygen uptake inhibition in *Procambarus clarkii*, red swamp crayfish by biodegradable surfactants: an ecotechnological approach for population control in rice fields. *Freshwater Crayfish* 11:235-242.
- Fontoura NF, Buckup L (1989) Dinâmica populacional e reprodução em *Parastacus brasiliensis* (Von Martens, 1869) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Revista Brasileira de Biologia* 49:911-921.
- Garcia F, Gonzalez-Baro M, Pollero R (2002) Transfer of lipids between hemolymph and hepatopancreas in the shrimp *Macrobrachium borellii*. *Lipids* 37:581-585.
- Gherardi F (2006) Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 175-191
- Gil-del Valle L, Martínez-Sánchez G, González-Blanco I, Pérez-Avila LJ (1999) Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Bioquímica* 24:85-93.
- Gil-Sanchez JM, Alba-Tercedor J (2002) Ecology of the native and introduced crayfishes *Austropotamobius pallipes* and *Procambarus clarkii* in southern Spain and implications for conservation of the native species. *Biological Conservation* 105:75-80.

- Girish BP, Swetha CH, Reddy PS (2014) Hepatopancreas but not ovary is the site of vitellogenin synthesis in female fresh water crab, *Oziothelphusa senex senex*. Biochemical and biophysical research communications 447(2), 323-327.
- Guadagnoli JA, Jones LA, Reiber CL (2005) The influence of reproductive state on cardiac parameters and hypoxia tolerance in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. Functional Ecology 19:976-981.
- Gutiérrez-Yurrita PJ, SanchoG, BravoM´ A, Baltan´as ´A, MontesC (1998) Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* in natural ecosystems of the Doñana National Park temporary fresh-water marsh (Spain). Journal of Crustacean Biology 18:120-127.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. 3a. Ed., Oxford, UK. 936 .
- Hau M, Hausmann MF, Greives TJ, Matlack C, Costantini D, Quetting M, Partecke J (2015) Repeated stressors in adulthood increase the rate of biological ageing. Frontiers in zoology 12:4.
- Hobbs, Jr. H.H (1988) Crayfish distribution, adaptive radiation and evolution, p.52-82. In: D.M. Holdich and R.S. Lowery (Eds.). Freshwater crayfish: biology, management and exploitation. Portland, Timber Press, VIII 498.
- Huner JV (1988) *Procambarus clarkii* in North America and elsewhere. In: Holdich D.M and Lowery R.S (eds). Freshwater Crayfish: Biology, Management and Exploitation 239-261.
- Huner JV, Bar JE (1984) Red Swamp Crayfish: Biology and Exploitation. Louisiana Sea Grant College Program, Baton Rouge, Louisiana 136.
- Hury AD, Benstead JP, Parker SM (2014) Seasonal changes in light availability modify the temperature dependence of ecosystem metabolism in an arctic

- stream. *Ecology* 95:2826-2839.
- Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (2016) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção: Anfíbios 287-320.
- Jeckel WH, de Moreno JEA, Moreno VJ (1990) Changes in biochemical composition and lipids of the digestive gland in females of the shrimp *Pleoticus muelleri* (Bate) during the molting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 96B:521-525.
- Jimenez AG, Kinsey ST. (2015). Energetics and metabolic regulation. *The Natural History of the Crustacea* 4:391-419.
- Koenig S, Solé M (2012) Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Marine Environmental Research* 79C:122-131.
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68:253-278.
- Loureiro TG, Anastácio PMSG, Araujo PB, Souty-Grosset C, Almerão MP (2015) Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion-an overview. *Nauplius* 23:1-19.
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101:13-30.
- Martínez-Cayuela M (1998) Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *ARS Pharmaceutica* 39:5-18.
- McKinney ML, Lockwood JL (1999) Biotic homogenization: A few winners replacing many losers in the next mass extinction. *Trends Ecology.Evolution* 14:450-453.
- Momot WT (1995) Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews*

- in Fisheries Science 3:33-63
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2014) Lehninger principles of biochemistry. Macmillan 6:1-1299.
- Noro CK, Buckup L (2008). Estrutura populacional e biologia reprodutiva de *Parastacus defossos* (Crustacea: Decapoda: Paratacidae). Revista Brasileira de Zoologia 25:624-629
- Oliveira GT, Da Silva RSM (1997). Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 118:1429-1435.
- Oliveira GT, Fernandes FA, Bond-Buckup G, Bueno AA, Da Silva RSM (2003) Circadian and seasonal variations in the metabolism of carbohydrates in *Aegla ligulata* (Crustacea: Anomura: Aeglidae). Memoirs of Museum Victoria 60:59-62.
- 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.
- Peiró, D.F.: Almerão, M.P.: Delaunay, C.: Jussila, J.: Makkonen, J.: Bouchon, D.: Araujo, P.B.: Souty-Grosset, C. 2016. First detection of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* in South America: a high potential risk to native crayfish. Hydrobiologia 781:181-190.
- Pinheiro LC (2014) Variações sazonais do metabolismo energético e do balanço oxidativo em *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) (Master's thesis, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).
- Pinheiro M, Boos H (2016) Livro vermelho dos crustáceos do Brasil. Porto Alegre,

RS: Sociedade Brasileira de Carcinologia - Sociedade Brasileira de Carcinologia, Vol.1.

Pinheiro LC, Oliveira GT (2016) Oxidative Status Profile in Different Tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a Seasonal Cycle. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 325:318-328.

Reid GK, Wood RD (1976) Ecology of Inland Wafers and Estuaries, 2nd edn. pp. 1485. D. Van Nostrand, New York.

Ribeiro, F. B., Buckup, L., Gomes, K. M., and Araujo, P. B. (2016). Two new species of South American freshwater crayfish genus *Parastacus* Huxley, 1879 (Crustacea: Decapoda: Parastacidae). Zootax 4158:301-324.

Formatado: Português (Brasil)

Ribeiro, F. B., Huber, A. F., Schubart, C. D., and Araujo, P. B. (2017). A new species of *Parastacus* Huxley, 1879 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) from a swamp forest in southern Brazil. Nauplius 25.

Richardson KL, Lopez Castro M, Gardner SC, Schlenk, D (2010) Polychlorinated biphenyls and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from the baja California peninsula of Mexico. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 58:183-193.

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

Santos, S., Bond-Buckup, G., Gonçalves, A. S., Bartholomei-Santos, M. L., Buckup, L., and Jara, C. G. (2017). Diversity and conservation status of *Aegla* spp.(Anomura, Aegliidae): an update. Nauplius, 25.

- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Leemans R (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287: 1770-1774.
- Schlenk D, Di Giulio RT (2002) Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In: *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. American Fisheries Society: Maryland.: Adams, S.M. (Ed.), 13-42.
- Silva-Castiglioni D, Dutra BK, Oliveira GT, Buckup L(2012) Comparison of the seasonal variation of the biochemical composition in two species of freshwater crayfish from southern Brazil. *Animal Biology* 62:53-82.
- Silva-Castiglioni D, 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: Molecular and Integrative Physiology* 148:204-213.
- Silva-Castiglioni D, Valgas AAN, Machado ID, Freitas BS, Oliveira GT (2016). Effect of different starvation and refeeding periods on macromolecules in the haemolymph , digestive parameters , and reproductive state in *Aegla platensis* (Crustacea , Decapoda , Aeglidae), *Marine and freshwater behaviour and physiology* 49:27-45
- Skinner DM (1985) Molting and regeneration. In Bliss, D.E., Mantel, L.H. (eds). *The biology of the Crustacea*, Vol.9. Academic Press, New York, 43-146.
- Smith TB, Kinnison MT, Strauss SY, Fuller TL, Carroll SP (2014) Prescriptive evolution to conserve and manage biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 45:1-22
- Suko T (1956) Studies on the development of crayfish .IV. Development of winter eggs. *Science Reports of Saitama University* 2I:213-219.

- Taketomi Y, Murata M, Miyawaki M (1990) Androgenic gland and secondary sexual characters in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Crustacean Biology* 10:492-497.
- Teshima S, Kanazawa A, Kakuta Y (1986) Effects of dietary phospholipids on growth and body lipid composition of the juvenile prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi* 52:155-158.
- Toon, A., Pérez-Losada, M., Schweitzer, C. E., Feldmann, R. M., Carlson, M., and Crandall, K. A. (2010). Gondwanan radiation of the Southern Hemisphere crayfishes (Decapoda: Parastacidae): evidence from fossils and molecules. *Journal of Biogeography* 37:2275-2290.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBDF, Manfredini V, Benfato MDS, Kubota LT (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. *Quimica Nova* 30:1323-38.
- Verri T, Mandal A, Zilli L, Bossa D, Mandal PK, Ingrosso L, Zonno V, Vilella S, Ahearn GA, Storelli C (2001). d-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology—Part A: Molecular and Integrative Physiology* 130:585-606.
- Vinagre AS, Da Silva RS (1992) Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 102:579-583.
- Vinagre, A. S., and Chung, J. S. (2016). Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). *Marine biology* 163:3.

- Weis JS (2010). The role of behavior in the success of invasive crustaceans. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 43:83-98.
- Wikelski M, Cooke SJ (2006) Conservation physiology. *Trends Ecology Evolution* 21:38-46.
- Yepiz-Plascencia G, Jimenez-Veja F, Romo-Figueroa MG, Sotelo-Mundo RR, Vargas-Albores F (2002) Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132B:585-592.
- Yepiz-Plascencia G, Vargas-Albores F, Higuera-Ciapara I (2000) Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture* 191:177-189.
- Zanotto FP, Wheatly MG (1993) The effect of ambient pH on electrolyte regulation during the postmoult period in freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Experimental Biology* 178:1-19.

Capítulo I

VARIAÇÕES BIOQUÍMICO-FUNCIONAIS DE FÊMEAS DE *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (CRUSTACEA, CAMBARIDAE) AO LONGO DO CICLO SAZONAL NO SUDESTE BRASILEIRO

Será submetido para Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology Conceito Biodiversidade CAPES A2 e fator de Impacto 1.812

Link para norma da revista: <https://www.journals.elsevier.com/comparative-biochemistry-and-physiology-part-a-molecular-and-integrative-physiology>

**VARIAÇÕES BIOQUÍMICO-FUNCIONAIS DE FÊMEAS DE
Procambarus clarkii (Girard, 1852) (CRUSTACEA, CAMBARIDAE) AO
LONGO DE UM CICLO SAZONAL NO SUDESTE BRASILEIRO**

Artur A N Valgas¹, Natália M A Wingen²: Guendalina T Oliveira², Paula B Araujo¹

¹Programa de Pós Graduação em Biologia Animal, Departamento de Zoologia,
Laboratório de Carcinologia, PPG Biologia Animal, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Programa de Pós-graduação em Zoologia, Departamento de Ciências
Morfofisiológicas, Laboratório de Fisiologia da Conservação, PPG Zoologia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

artur.valgas@acad.pucrs.br

natalia.wingen@acad.pucrs.br

guendato@pucrs.br

pabearaujo@gmail.com

Autor correspondente:

guendato@pucrs.br

CEP: 90619-900, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Bloco C, sala 205 - Caixa Postal
Partenon, Porto Alegre - RS, Brasil.

Telefone (+5551) 33203545 ramal 8324

Resumo

Procambarus clarkii é um lagostim de água doce nativo do centro sul dos Estados Unidos e norte do México, que apresenta alta plasticidade fisiológica e grande capacidade reprodutiva. No Brasil, esta espécie está presente em ambiente natural somente no estado de São Paulo, onde já foram encontradas diversas populações. Neste estudo quantificamos e caracterizamos marcadores nutricionais (grau de repleção estomacal), da reprodução (índice gonado e hepatossomático, grau de maturação gonadal) do metabolismo intermediário (glicogênio, glicose, proteínas totais, ácido úrico, lipídios totais, triglicerídeos e colesterol), do balanço oxidativo (superóxido dismutase, catalase, glutatona S-transferase e TBARS) em fêmeas de *P. clarkii*, coletadas em ambiente natural, ao longo de um ciclo sazonal. Para tal, foram utilizados o estômago e as gônadas, além de amostras da hemolinfa, do músculo abdominal e do hepatopâncreas. Observou-se um grande investimento fisiológico na reprodução, com mobilização de reservas energéticas do hepatopâncreas e músculo para a maturação gonadal. Este grande investimento em reprodução parece tornar estes animais suscetíveis a estressores ambientais durante o pico reprodutivo, pois há um aumento de lipoperoxidação e de atividade SOD e GST. Os resultados deste trabalho podem subsidiar estratégias de controle das populações de *P. clarkii* em ambientes onde é introduzida.

Palavras-chaves

Crustacea: Lagostim: Reprodução: Metabolismo Intermediário: Balanço Oxidativo

Introdução

Procambarus clarkii é um lagostim de água doce nativo do centro sul dos Estados Unidos e norte do México, que apresenta alta plasticidade fisiológica (Bissattini et al. 2015; Bush et al. 2016; Goretti et al. 2016; Powell et al. 2010; Peruzza et al. 2015) alto investimento reprodutivo (600 ovos por evento reprodutivo) e desenvolvimento rápido (Momot 1995; Suko 1956). A espécie foi introduzida em muitos países e é considerada invasora, inclusive com registro de relação com o declínio de comunidades de anfíbios e artrópodes (Cruz et al. 2008). No Brasil esta espécie de lagostim já foi introduzida em ambiente natural, sendo encontrada até o momento somente no estado de São Paulo, onde Loureiro et al. (2015) constataram 17 populações estabelecidas da espécie.

Inúmeros estudos demonstram que animais com diferentes hábitos de vida apresentam estratégias bioquímicas e funcionais variadas que lhes garante não só a sobrevivência como também o sucesso na reprodução (Braghirolli, et al. 2016; Silva-Castiglioni et al. 2012). A caracterização de variações metabólicas e funcionais dos organismos ao longo das estações do ano são importantes para indicar como os animais reagem frente ao ambiente, como também auxiliam na detecção de períodos de suscetibilidade destes organismos a agentes estressores (Adams et al. 1985; Koenig and Solé 2012).

O processo fisiológico da reprodução em fêmeas de decápodes é normalmente, mais custoso que para os machos, uma vez que há a necessidade de alocação de reservas metabólicas para a maturação gonadal, gametogênese e síntese de vitelogenina, principal substrato energético utilizado pelos embriões e fases iniciais pós-eclosão (juvenis), como também para o cuidado parental (Jimenez and Kinsey 2015; Oliveira et al. 2007; Pinheiro and Oliveira 2016). A energia dispendida

associada com a reprodução está, normalmente, refletida no aumento da demanda metabólica, consumo de oxigênio, duplicação da ingesta de alimentos, diminuição do crescimento e aumento da suscetibilidade a predadores (Berglund and Rosenqvist 1986: Guadagnoli et al. 2005).

Os crustáceos exibem variações sazonais no comportamento, crescimento e atividade reprodutiva (Thongda et al. 2015). Em geral a reprodução ocorre durante as estações com maior temperatura, quando há depleção de reservas energéticas teciduais a fim de manter atividades reprodutivas. Em temperaturas mais frias há diminuição destes processos e uma alocação de substratos energéticos de reserva para os tecidos, sobretudo no hepatopâncreas e músculo (Oliveira et al 2007: Silva-Castiglioni et al 2007, 2008, 2012: Thongda et al 2015).

Os lipídeos e as proteínas parecem ser os principais substratos mobilizados durante a reprodução (Antunes et al. 2010: Rosa and Nunes 2003). Diversos estudos demonstram uma alocação das reservas de lipídeos e proteínas do hepatopâncreas e/ou do trato digestório para as gônadas durante a maturação gonadal, sendo a quantidade de lipídeos acumulada neste órgão bastante elevada (Girish et al. 2014: Jimenez and Kinsey 2015: Silva-Castiglioni et al. 2015). A vitelogenina, é sintetizada no hepatopâncreas e nos ovários e é rica em lipoproteínas de alta densidade associadas com glicoproteínas (Jimenez and Kinsey 2015: Pinheiro and Oliveira 2016).

A maior demanda energética nas gônadas e o incremento do consumo de oxigênio pode determinar uma maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Lesser et al. 2006). A produção de EROs é uma importante resposta bioquímica e fisiológica para animais aquáticos expostos a diferentes estressores ambientais (Lesser et al. 2006), podendo estas serem utilizadas por células imunológicas no combate de patógenos, reações autoimunes e oxidação de agentes químicos exógenos ao organismo

(Apel and Hirt et al. 2004). Contudo, como as EROs têm forte propriedade oxidativa quando em concentrações citoplasmáticas altas, disfunções metabólicas, apoptose e danos teciduais podem ocorrer (Halliwell and Gutteridge 1999) devido a danos em proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Gil-del Valle et al. 1999; Martínez-Cayuela 1999).

Os lagostins de água doce são animais que apresentam um alto investimento energético ligado à reprodução (Silva-Castiglioni et al. 2012; Yazicioglu et al. 2016). Essa maior demanda energética gerada pela reprodução acarreta em mais formação de EROs, que é contrabalanceada por um sistema antioxidante (Fanjul-Moles and Gonsebatt 2012; Pinheiro and Oliveira 2016). Lagostins expostos a diferentes xenobióticos mostraram respostas antioxidantes eficientes, prevenindo dano oxidativo aos tecidos (Lindova et al 2016; Struzyński et al. 2014; Wei and Yang 2015).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar aspectos bioquímico-funcionais ligados ao metabolismo intermediário e balanço oxidativo de fêmeas de *Procambarus clarkii* ao longo de um ciclo sazonal, a fim de responder as seguintes questões: (1) Qual período reprodutivo da espécie no Brasil? (2) Qual o período de maior demanda energética? (3) Quais estratégias de alocação de substrato energético esta espécie utiliza em cada período do ano para manutenção de sua homeostase? (4) Há algum período de maior suscetibilidade a agentes estressores?

Material e Métodos

Coleta de material biológico

Foram coletadas 99 fêmeas de *Procambarus clarkii* ao longo de um ciclo sazonal (Verão= 29: Outono=20: Inverno=30 e Primavera=20 animais) no Parque Municipal Alfredo Volpi, na Cidade de São Paulo, SP, Brasil (23°35'16"S 46°42'09"W) no ano de 2016. Para a captura dos animais foi utilizada armadilha com atrativo de ração de gatos, sabor peixe, acondicionada em um recipiente furado que permitia a liberação de pistas químicas, mas impedia os animais de ingerirem a ração. As coletas foram autorizadas pela licença do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (45775152 e 36548762) (Fig. 1).

Os animais foram pesados com uso de pesola de 30g (precisão de 0,25g) e as amostras de hemolinfa foram coletadas com uso de seringas de insulina contendo oxalato de potássio (10%), como anticoagulante. Após, os animais foram crioeutanasiados. O músculo abdominal, hepatopâncreas, gônadas e estômago foram removidos em campo sob banho de gelo (Fig .2), congelados em freezer e transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Fisiologia da Conservação, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS. No laboratório as amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C até a quantificação dos diferentes parâmetros bioquímicos.

Maturação Gonadal

A maturação gonadal foi determinada conforme a coloração das gônadas: branca e creme (gônadas imaturas), e marrom e preta (gônadas maduras) (McClain et al. 2007)

(Fig. 3).

Grau de repleção gástrica

Os estômagos foram categorizados em classes quanto a seu grau de repleção estomacal (GR), determinado visualmente conforme escala de seis classes (Willians 1981): Classe 1 = 0% - vazio; Classe 2 = < 5% - parcialmente vazio; Classe 3 = 5 a 35% - vazio/ médio; Classe 4 = 35 a 65% - médio; Classe 5 = 65 a 95% - médio/ cheio; Classe 6 = > 95% - cheio.

Índices gonadossomático e hepatossomático

O índice gonadossomático foi determinado como segue: $IG = (Mg/Mt).100$:
Mg= Massa gonadal e Mt= Massa total do indivíduo

O índice hepatossomático: $IH = (Mh/Mt). 100$: Mh= Massa do hepatopâncreas e
Mt= Massa total do indivíduo.

Metabolismo

Os metabólitos plasmáticos glicose, proteínas totais, ácido úrico, triglicerídeos, colesterol total foram quantificados em duplicata, por espectrofotometria com uso de kits comerciais BioTécnica: Biotecnologia Avançada. Os lipídeos totais foram medidos pelo método da sulfosfosovanilina (Frings and Dunn, 1970) e o colesterol VLDL, obtido por relação matemática $TGL/5$ (onde TGL é o valor de triglicerídeos circulantes na hemolinfa) (Friedwald et al. 1972).

Todas as análises bioquímicas dos metabólitos teciduais foram realizadas

utilizando kits por meio de espectrofotometria, sendo determinadas em duplicata para cada órgão/animal. O glicogênio foi extraído segundo o método de Van Handel (1965) e quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃), utilizando-se o kit comercial BioTécnica: Biotecnologia Avançada, sendo este baseado no método da glicose oxidase. Os níveis de proteínas totais foram quantificados com uso de kit da BioTécnica: Biotecnologia Avançada. Os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Folch et al. (1957) e medidos pelo método da sulfosfosvanilina (Frings and Dunn 1970). Os triglicerídeos e o colesterol total foram extraídos pelo método de Folch et al. (1957) e quantificados por uso de kits específicos BioTécnica: Biotecnologia Avançada.

Balanco oxidativo

Os tecidos muscular abdominal, hepatopancreático e gonadal foram homogeneizados em ultra-turrax com uma solução de tampão fosfato (20 mM) acrescido de cloreto de potássio (140 mM) e inibidor de proteases (PMSF em 1 mM), em uma proporção 1g para cada 5 ml de solução. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas em 1000xg, por 10min, em 4 °C o sobrenadante da centrifugação foi coletado, aliqotado e congelado a -20°C, para posterior quantificação dos parâmetros do balanço oxidativo.

A determinação da superóxido dismutase (SOD) foi baseada na inibição da reação do radical superóxido em presença de adrenalina. Nesta reação, a SOD compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção formando um composto corado (adrenocromo) que é quantificado espectrofotometricamente 480nm e expressa em U.mg proteína⁻¹ (Boveris et al. 1982). Como não se pode determinar a atividade da enzima em termos de substrato consumido por unidade de tempo, utiliza-se a quantificação em unidades relativas. A atividade da Catalase (CAT) foi quantificada

pelo decaimento do peróxido de hidrogênio da amostra, detectado a 240nm e expressa em pmols. mg proteína⁻¹.min⁻¹ (Boveris and Chance 1973). A atividade da glutathione S-Transferase (GST) foi mensurada pela conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB), com redução da glutathione (GSH), detectado em 340nm e expressa em mmols. mg proteína⁻¹ (Habig et al. 1981). Os níveis de lipoperoxidação (LPO) foram quantificados por meio da detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são detectados em 520nm e expresso em μmols. mg proteína⁻¹ (Lima et al. 2001).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão. Os resultados obtidos foram analisados nos programas SPSS 20.0 e Bioestat 5.0. A normalidade dos dados foi verificada, através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados mostraram uma distribuição não paramétrica sendo assim, utilizado o teste de comparação de Kruskal-Wallis seguido de o teste complementar de Dunn, sendo considerados significantes para um $p < 0.05$ (Zar 2010).

Resultados

A maturação gonadal no verão 52% das gônadas apresentou-se, maduras, no outono 27%, no inverno apenas 10% e na primavera 20% (Fig.4A). Observou-se predominância de estômagos nas categorias 1 a 3 no verão (73%), 4 a 6 (60%) no inverno e 4 a 6 (90%) na primavera. No outono estômagos apresentaram-se nas categorias 1 a 3 (50%) e 4 a 6 (50%) (Fig.4B). O índice gonadossomático apresentou uma diminuição significativa do verão até a primavera (Fig.4C), enquanto que o índice hepatossomático apresentou um aumento significativo também até a primavera

(Fig.4D).

Nos metabólitos hemolinfáticos (Tabela. 1), observou-se manutenção de glicose circulante ao longo do ano ($p>0,05$). Houve diminuição de proteínas totais durante o inverno e a primavera, aumento de ácido úrico na primavera. Os lipídeos totais mantiveram-se ao longo do ano ($p>0,05$) e diminuição significativa nos triglicerídeos, no colesterol total e no colesterol VLDL nos períodos de inverno e primavera.

Em relação aos metabólitos teciduais (Tabela.1), observou-se aumento significativo das reservas musculares de glicogênio no inverno e primavera, enquanto que no hepatopâncreas há o aumento desta reserva no inverno e nas gônadas na primavera. As proteínas mantêm-se no músculo ($p>0,05$) com depleção no inverno no hepatopâncreas, retorno na primavera, e nas gônadas, apresentam diminuição no inverno e primavera. No músculo os lipídeos totais apresentam um aumento significativo na primavera, enquanto que no hepatopâncreas se mantêm estáveis ao longo do ano ($p>0,05$). Nas gônadas, os lipídeos apresentam redução no inverno com posterior aumento na primavera. Foi constatado uma diminuição significativa das reservas de triglicerídeos no músculo e hepatopâncreas nas estações outono e primavera. O verão apresentou um pico de triglicerídeos no verão em relação às gônadas. O colesterol total aumentou no músculo e hepatopâncreas no outono, enquanto, nas gônadas houve uma redução gradual até a primavera (Tabela.1).

A atividade de SOD no musculo diminuiu no outono e primavera, manteve-se no hepatopâncreas ($p>0,05$) e na gônada, diminuiu no outono (Fig.5A). A atividade de CAT no músculo e hepatopâncreas diminuíram no outono e inverno e na gônada, não houve diferença ao longo do ano ($p>0,05$)(Fig.5B). A atividade de GST no músculo

reduziu no outono e primavera, no hepatopâncreas, aumentou no inverno e, diminuiu na primavera, e nas gônadas diminuiu no outono e primavera (Fig.5C). Os níveis de LPO no músculo foram maiores no verão, no hepatopâncreas, no inverno e nas gônadas no verão e inverno (Fig.5D).

Discussão

Este trabalho é o primeiro que evidencia aspectos bioquímico-fisiológicas em fêmeas de *P. clarkii* coletados ao longo de um ciclo sazonal, em ambiente natural no sudeste do Brasil. Foi possível constatar que a espécie se reproduz ao longo de todo o ano, pois há a presença de gônadas maduras em todas as estações. Contudo, há um pico reprodutivo no verão, quando o percentual de gônadas maduras é superior a 50%. Semelhante do que observado no local de origem da espécie onde a reprodução começa ao final da primavera e verão (Avault and Jaspers 1970 in Oluich 1990).

Durante o verão, também se observa uma predominância de estômagos vazios, menor índice hepatossomático, maior índice gonadossomático e alto percentual de gônadas maduras. Sabe-se que as fêmeas de decápodes reduzem sua atividade alimentar durante o período reprodutivo, priorizando comportamentos reprodutivos, mudas nupciais e cuidados parentais (Swetha et al. 2011). A redução do índice hepatossomático e o aumento do índice gonadossomático parecem estar intimamente associados com a alocação de reservas energéticas do hepatopâncreas para as gônadas durante o período reprodutivo, como também visto para o caranguejo *Oziothelphusa senex* (Girish et al. 2014). Estes dados corroboram os dados de maturação gonadal que apontam o verão como pico reprodutivo da espécie no Brasil.

Os níveis de metabólitos hemolinfáticos refletem o transporte destes a partir do trato digestório para os tecidos e no sentido contrário, oriundos do catabolismo das

reservas energéticas de um tecido para os outros tecidos/órgãos (Silva-Castiglioni et al. 2015). Em *P.clarkii* observou-se a manutenção dos níveis circulantes de glicose na hemolinfa ao longo do ano, o que pode estar relacionado ao papel da glicose como substrato energético para o sistema nervoso e para sustentar a atividade muscular como relatado por Jimenez and Kinsey 2015. Cabe ressaltar que a glicose é o principal monossacarídeo circulante em crustáceos (Kucharski e da Silva, 1991). A redução dos níveis de proteínas circulantes no inverno e primavera parece estar associada com transferência destas para a síntese de viteologenina, substrato para síntese de ATP ou para a gliconeogênese, uma vez que há aumento das reservas de glicogênio no hepatopâncreas e músculo, aliada a manutenção da glicemia. Oliveira and da Silva (1997), Pellegrino et al. (2013) e Vinagre and Da Silva 2002, demonstraram a capacidade gliconeogênica a partir de aminoácidos no hepatopâncreas e no músculo de caranguejo estuarino *Neohelice granulata*. Comitadamente com a diminuição de proteínas totais existe um aumento dos níveis de ácido úrico circulante, o que pode indicar uma síntese de ácido úrico a partir do metabolismo destas proteínas e da respectiva desaminação dos aminoácidos resultantes deste processo.

A manutenção dos níveis circulantes de lipídeos totais ao longo do ano pode estar aliada a uma diminuição dos níveis de triglicerídeos e colesteróis, o que, segundo Harvery et al.(2012) e Girish et al. (2014) pode indicar maior liberação para a hemolinfa de ácidos graxos e glicerol a partir da degradação de triglicerídeos, assim como também pode estar associado a uma alta atividade das vias de gliceroneogênicas, como relatado por Sarapio et al (2017) em *Neohelice granulata* . O aumento dos triglicerídeos e do colesterol no verão parece estar associado à alocação destes metabólitos dos tecidos para a maturação gonadal, a síntese de vitelo e de hormônios sexuais. Tal hipótese é corroborada pelos altos níveis de VLDL, que é uma

lipoproteína que transporta lipídios do hepatopâncreas para os tecidos através da circulação (Buckup et al. 2008; Oliveira et al. 2007; Vinagre et al. 2007; Vinagre and Chung 2016; Silva-Castiglioni et al. 2007 e 2012; Musin et al. 2017).

O aumento das reservas musculares de glicogênio, durante o inverno e a primavera, indica relação com a maior atividade alimentar durante este período, uma vez que observaram-se estômagos em categorias cheias nestas estações. Os altos níveis das reservas de glicogênio no hepatopâncreas durante o inverno e na gônada durante a primavera, indica uma mobilização desta reserva do hepatopâncreas para as gônadas, a fim de sustentar os eventos associados à reprodução, o que é suportado por trabalhos com outros decápodes (Silva-Castiglioni et al. 2007 e 2015; Fátima et al. 2013).

Apesar de o músculo ser o principal sítio de estocagem de proteínas em crustáceos segundo Jimenez and Kinsey (2015), observou-se que as reservas proteicas utilizadas para obtenção de energia e assim colaborando na manutenção da glicemia no inverno foram provindas do hepatopâncreas e não do músculo. Os aminoácidos resultantes do catabolismo proteico podem estar sendo utilizados para a síntese de glicose através da gliconeogênese, uma vez que há a manutenção de glicemia e o incremento das reservas de glicogênio neste período. As maiores concentrações de proteínas nas gônadas durante o verão, pode estar relacionado com o pico reprodutivo da espécie e a síntese de vitelogenina no hepatopâncreas e/ou nos oócitos como sugerido por Guan et al (2016) .

A redução de lipídeos no músculo durante o verão indica o uso destes pelo próprio tecido a fim de sustentar os comportamentos de cuidado parental e limpeza de ovos. Cabe lembrar que nesta estação (verão) verificaram-se os mais baixos valores de

repleção estomacal sugerindo uma diminuição de a atividade alimentar. No outono existe uma tendência de aumento das reservas de lipídeos no hepatopâncreas que pode estar relacionada com o retorno da atividade alimentar após o pico reprodutivo. A menor atividade reprodutiva durante o inverno é verificada por uma grande proporção de gônadas imaturas e baixos estoques de lipídeos nas gônadas, padrão já relatado por outros autores (Buckup et al. 2008; Dutra et al. 2008; Figler et al. 1995; Musin et al. 2017; Oliveira et al. 2007; Silva-Castiglioni et al. 2007 e 2012).

Os menores estoques durante o outono e primavera de triglicerídeos no músculo e hepatopâncreas, podem estar relacionadas com o catabolismo dessa reserva para sustentar a maturação gonadal, já que os triglicerídeos são a principal fonte de ácidos graxos utilizados para a síntese de ATP e vitelogenina (Guan et al. 2016). Em relação aos estoques gonádicos de triglicerídeos, observou-se um pico no verão, condizendo com seu uso na gametogênese e síntese de vitelogenina, assim como visto por Guan et al. (2016). Nos meses de outono, os níveis de colesterol total presente no músculo e no hepatopâncreas parecem estar sendo utilizados para reestruturação tecidual após o período reprodutivo e sendo mobilizado para uso na muda, Gu et al. (2017) e Han et al. (2017) evidenciaram em seus estudos a importância do colesterol para o crescimento de juvenis de *Macrobrachium nipponense* e *Portunus trituberculatus*. Cabendo ressaltar que o colesterol é um importante constituinte de membranas celulares e precursor de hormônios ecdiesteróides (Jimenez and 2015). Nas gônadas observou-se uma elevada concentração de colesterol durante o pico reprodutivo (verão), que pode estar relacionado com o uso deste metabólito para gametogênese e estruturação do tecido gonadal durante a reprodução e para a síntese de hormônios sexuais e ovos, assim como sugerido por Jimenez and Kinsey (2015) em sua revisão para outros crustáceos.

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes no músculo observou-se um aumento da superóxido dismutase aliado a um aumento dos níveis de lipoperoxidação (TBARS) nos meses de verão, sugerindo assim, que o incremento da demanda energética e do consumo de oxigênio neste tecido durante o pico reprodutivo não foi compensado pelo incremento de atividade da SOD, conduzindo assim, a um aumento na formação de EROs como também observado por Pinheiro e Oliveira (2016) em *Parastacus brasiliensis promatensis*. Já nas gônadas observou-se uma diminuição de atividade da SOD no outono o que parece estar associada ao término do pico reprodutivo (Braghirolli et al. 2016; Fanjul-Moles and Gonsebatt 2012:). Em relação à atividade de CAT, o músculo e o hepatopâncreas apresentaram um aumento da atividade durante o outono e primavera, que pode estar relacionado à manutenção do *status* oxidativo tecidual, evitando assim, danos oxidativos possivelmente associados a muda e ao preparo para o pico reprodutivo, padrão já sugerido por Fanjul-Moles and Gonsebatt (2012). As gônadas não apresentaram diferença significativa para a atividade de CAT.

O aumento da capacidade antioxidante enzimática no período que antecede o pico reprodutivo é reforçado pelo incremento da síntese de ácido úrico circulante, uma vez que esta molécula apresenta capacidade antioxidante. A síntese de ácido úrico em organismos amoniotélicos, para uso como antioxidante foi relatado para insetos (Hermes-Lima and Zenteno—Savin 2002) e para girinos (Coltro et al. 2017): sendo este trabalho o primeiro a relatar para crustáceos.

A maior atividade de GST no verão e inverno no músculo e gônada pode estar relacionada à maior atividade tecidual e formação de subprodutos endobióticos de vias metabólicas, assim como demonstrado por Van Der Aar et al. (1998). Isso acontece devido a uma maior demanda energética no verão, relacionado ao pico reprodutivo e no

inverno uma alocação reservas para estes tecidos. O aumento da atividade de GST no hepatopâncreas durante o inverno está aliado a maior atividade alimentar destes animais durante este período, visto que este órgão atua como principal órgão metabolizador de compostos provindos da dieta. Padrão similar foi observado em trabalho com *Parastacus brasiliensis promatensis* (Pinheiro and Oliveira et al. 2017).

Os níveis altos de LPO no musculo e gônadas no verão coincidem com o pico reprodutivo da espécie, isto se deve a possível maior demanda energética, havendo a redução dos estoques teciduais de glicogênio, maior consumo de oxigênio para sustentar a reprodução, que por sua vez pode conduzir a um incremento na formação de espécies reativas do oxigênio como subprodutos de vias oxidativas para a produção de ATP. As gônadas possuem aumento da atividade tecidual para a síntese e maturação dos ovos (gametogênese e vitelogenina), e no músculo a maior atividade está relacionada à busca de parceiros, sustentação de comportamentos reprodutivos, cópula e cuidado parental de ovos e juvenis, como já sugerido por outros trabalhos (Fanjul-Moles and Gonsebatt 2012; Braghirolli et al. 2016; Pinheiro and Oliveira 2016). No hepatopâncreas observou-se aumento de LPO conforme há o aumento da atividade alimentar (grau de repleção estomacal), o que pode estar relacionado com o incremento na digestão, na absorção e na estocagem dentro do próprio órgão como também na disponibilização dos nutrientes aos outros órgãos.

As fêmeas de *Procambarus clarkii* apresentam alto grau de investimento na reprodução, estando este evento associado a uma diminuição da atividade alimentar e a mobilização de substratos energéticos. Este investimento traz consigo um ônus durante o pico reprodutivo da espécie, conduzindo a um incremento do dano oxidativo. Esse dano oxidativo pode ser chave para as estratégias de manejo em ambientes onde este lagostim é invasor, visto que talvez não tenha capacidade de manter a atividade

reprodutiva ou de sobreviver, quando outras formas de estresse ocorram neste período. Mais estudos visando entender o efeito de múltiplos estressores ambientais durante o período reprodutivo devem ser realizados para o estabelecimento de planos de manejo que tenham sucesso em seu controle.

Agradecimentos

Agradecimentos a CAPES pela bolsa concedida a AANV e ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho e à bolsa de produtividade a GTO (307071/2015-4) e PBA (305900/2014-5): ao Dr. Sérgio Bueno da Universidade do Estado de São Paulo pelo auxílio em campo, a Msc. Tainã Loureiro da UFRGS pelo auxílio e treinamento para o manejo e identificação dos animais, nos preparativos para o trabalho de campo, obtenção de licenças e contato com os responsáveis pelo parque Alfredo Volpi, aos biólogos Luíza Petroli e Rodrigo Nizolli pelo auxílio em laboratório.

Referências

- Adams SM, McLean RB (1985) Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology* 26(C):111-126.
- Antunes GF, Nunes do Amaral AP, Ribarcki FP, Wiilland EF, Zancan DM, Vinagre AS (2010) Seasonal variations in the biochemical composition and reproductive cycle of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 313(A):280-291.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-99.
- Avault JW, Jaspers E (1970) Culture of crawfish, Louisiana's crustacean king.

- American Fish Farmer 1:8-14.
- Beaulieu M, Costantini D (2014) Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology* 2:1-16.
- Berglund A, Rosenqvist G (1986) Reproductive costs in the prawn *Palaemon adspersus*: effects on growth and predator vulnerability. *Oikos* 46:349-354.
- Bissattini AM, Traversetti L, Bellavia G, Scalici M (2015) Tolerance of increasing water salinity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Journal of Crustacean Biology* 35(5):682-685.
- Boveris A, Cadenas E (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. Superoxide dismutase. Oberley LW (ed.) 2: 15.
- Boveris A, Chance B (1973) The Mitochondrial Generation of Hydrogen Peroxide: General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 134:707-716.
- Braghirolli FM, Oliveira MR, Turcato G (2016) Ecotoxicology and Environmental Safety Seasonal variability of metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyaella kaingang* (Crustacea, Amphipoda). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 130:177-184.
- Buckup L, Dutra BK, Ribarcki FP, Fernandes FA, Noro CK, Oliveira GT, Vinagre AS (2008) Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology* 149:59-67.
- Bush N, Bush E, Green C, Anderson J, Blanchard P, Bush N, Conover J (2016) Mitigation of hypoxic ecosystems using hemolymph analysis of *Callinectes sapidus* and *Procambarus clarkii* in relation to *Spartina* grasses. *Open Journal of*

- Ecology 6:484.
- Coltro M, da Silva PR, Valgas AAN, Miguel C, de Freitas BS, Oliveira GT (2017) Influence of the herbicide Facet® on corticosterone levels, plasma metabolites, and antioxidant system in the liver and muscle of american bullfrog tadpoles. *Water, Air, and Soil Pollution* 228:241.
- Cruz MJ, Segurado P, Sousa M, Rebelo R (2008) Collapse of the amphibian community of the Paul do Boquilobo Natural Reserve (central Portugal) after the arrival of the exotic American crayfish *Procambarus clarkii*. *The Herpetological Journal* 18:197-204.
- 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: Molecular and Integrative Physiology* 151:322-328.
- Fanjul-Moles M L, Gonsebatt ME (2011) Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycles. *Oxidative stress in aquatic ecosystems* 208-223.
- Fatima H, Ayub Z, Ali SA, Siddiqui G (2013) Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). *Turkish Journal of Zoology* 37:334-347.
- Figler MH, Twum M, Finkelstein JE, Peeke HV (1995) Maternal aggression in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard): the relation between reproductive status and outcome of aggressive encounters with male and female conspecifics. *Behaviour* 132:107-125.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson, DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative

- ultracentrifuge. *Clinical chemistry*, 18:499-502.
- Folch J, Lees M, Stanley H (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497-509.
- Frings CS, Dunn RT (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *American Journal of Clinical Pathology* 53:89-91
- Gil-del Valle L, Martínez-Sánchez G, González-Blanco I, Pérez-Avila LJ (1999) Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmuno deficiencia humana. *Bioquímica* 24:85-93.
- Girish BP, Swetha CH, Reddy PS (2014) Hepatopancreas but not ovary is the site of vitellogenin synthesis in female fresh water crab, *Oziothelphusa senex senex*. *Biochemical and biophysical research communications* 447:323-327.
- Goretti E, Pallottini M, Ricciarini MI, Selvaggi R, Cappelletti D (2016) Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels. *Science of the Total Environment* 559:339-346.
- Gu X, Fu H, Sun S, Qiao H, Zhang W, Jiang S, Wu Y. (2017) Effects of cholesterol on growth, feed utilization, body composition and immune parameters in juvenile oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture Research*, 48:4262-4271.
- Guadagnoli JA, Jones LA, Reiber CL (2005) The influence of reproductive state on cardiac parameters and hypoxia tolerance in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Functional Ecology* 19:976-981.
- Guan ZB, Yin J, Chen K, Shui Y, Cai YJ, Liao LR (2016) The hepatopancreas and

- ovary are the sites of vitellogenin synthesis in female red swamp crayfish (*Procambarus clarkii* Girard, 1852) (Decapoda: Astacoidea: Cambaridae). *Journal of Crustacean Biology* 36:637-641.
- Habig WH, Jakoby WB (1981) Glutathione S-Transferase (rat and human). *Methods in Enzymology* 77:218-239.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University 3rd edn. Oxford, United Kingdom 936
- Han T, Wang JT, Li XY, Yang YX, Yang M, Tian HL, Wang CL (2017) Effects of dietary phospholipid and cholesterol levels on growth and fatty acid composition of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture Nutrition* 24:164-172
- Harvey HR, Pleuthner RL, Lessard EJ, Bernhardt MJ, Shaw CT (2012) Physical and biochemical properties of the euphausiids *Thysanoessa inermis*, *Thysanoessa raschii*, and *Thysanoessa longipes* in the eastern Bering Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 65:173-183.
- Hermes-Lima M, and Zenteno-Savín T (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 133:537-556.
- Jimenez AG, Kinsey ST (2015) Energetics and metabolic regulation. *The Natural History of the Crustacea* 4:391-419.
- Koenig S, Solé M (2012) Natural variability of hepatic biomarkers in Mediterranean deep-sea organisms. *Marine Environmental Research* 79:122-131.
- Kucharski LCR, Da Silva RSM (1991) Seasonal variation on the energy metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology* 100:599-602.

- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68:253-78.
- Lima ES, Abdalla DSP (2001) Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 37:293-303.
- Lindova J, Stara A, Kouba A, Velisek J (2016) The effects of cypermethrin on oxidative stress and antioxidant biomarkers in marbled crayfish (*Procambarus fallax f. virginialis*). *Neuroendocrinology Letters* 37:1.
- Loureiro TG, Anastácio PMSG, Araujo PB, Souty-Grosset C, Almerão MP (2015)a Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion -an overview. *Nauplius* 23:1-19.
- Loureiro TG, Anastácio PM, Bueno SL, Araujo PB, Souty-Grosset C, Almerão MP (2015)b Distribution, introduction pathway, and invasion risk analysis of the North American crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Southeast Brazil. *Journal of Crustacean Biology* 35:88-96.
- Martínez-Cayuela M (1998) Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 39:5-18.
- McClain WR, Romaine RP, Lutz CG, Shirley MG (2007) Louisiana crawfish production manual. Louisiana state University Agriculture Center: Baton Rouge, LA
- Momot WT (1995) Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science* 3:33-63
- Musin GE, Rossi A, Diawol VP, Collins PA, Williner V (2017) Dynamic metabolic pattern of *Aegla uruguayana* (Schmitt, 1942) (Decapoda: Anomura: Aeglididae): responses to seasonality and ontogeny in a temperate freshwater environment. *The Journal of Crustacean Biology* 37:436-444.

- 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: Molecular and Integrative Physiology* 147:600-606.
- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comparative Biochemistry and Physiology A: physiology* 118:1429-1435.
- Pellegrino R, Martins TL, Pinto CB, Schein V, Kucharski LC, Da Silva RSM (2013) Effect of starvation and refeeding on amino acid metabolism in muscle of crab *Neohelice granulata* previously fed protein-or carbohydrate-rich diets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 164:29-35.
- Peruzza L, Piazza F, Manfrin C, Bonzi LC, Battistella S, Giulianini PG (2015) Reproductive plasticity of a *Procambarus clarkii* population living 10° C below its thermal optimum. *Aquatic Invasions* 10:2.
- Pinheiro LC, Oliveira GT (2016) Oxidative Status Profile in Different Tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a Seasonal Cycle. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 325:318-328.
- Powell ML, Watts SA (2010) Response to Long-term Nutrient Deprivation and Recovery in the Crayfishes *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus* (Crustacea, Decapoda): Component and Proximate Analyses. *Journal of the World Aquaculture Society* 41:71-80.
- Qiu J, Wang WN, Wang LJ, Liu YF, Wang AL (2011) Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*

- exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 154:36-41.
- Rosa RA, Nunes ML (2003) Changes in organ indices and lipid dynamics during the reproductive cycle of *Aristeus antennatus*, *Parapenaeus longirostris* and *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Decapoda) females from the south Portuguese coast. *Crustaceana* 75:1095-1105.
- Sarapio, E., Santos, J. T., Model, J. F. A., De Fraga, L. S., Vinagre, A. S., Martins, T. L and Trapp, M. (2017). Glyceroneogenesis in the hepatopancreas of the crab *Neohelice granulata*: Diet, starvation and season effects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 211:1-7.
- Silva-Castiglioni D, 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: Molecular and Integrative Physiology* 148:204-213.
- Silva-Castiglioni D, Dutra BK, Oliveira GT, Buckup L (2012) Comparison of the seasonal variation of the biochemical composition in two species of freshwater crayfish from southern Brazil. *Animal Biology* 62:53-82
- Silva-Castiglioni D, López-Greco L, Oliveira GT, Bond-Buckup G (2008) Characterization of the sexual pattern of *Parastacus varicosus* (Crustacea: Decapoda: Parastacidae). *Invertebrate Biology* 127:426-432.
- Silva-Castiglioni D, Valgas AAN, Machado ID, Freitas BS, Oliveira GT (2015). Effect of different starvation and refeeding periods on macromolecules in the haemolymph, digestive parameters, and reproductive state in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda, Aeglididae), Marine and freshwater behaviour and

physiology 49:27-45.6244

- Strużyński W, Dąbrowska-Bouta B, Grygorowicz T, Ziemińska E, Strużyńska L (2014) Markers of oxidative stress in hepatopancreas of crayfish (*Orconectes limosus*, raf) experimentally exposed to nanosilver. *Environmental toxicology* 29:1283-1291.
- Suko T (1956) Studies on the development of crayfish. IV. Development of winter eggs. *Science Reports of Saitama University* 2:213-219
- Swetha CH, Sainath SB, Reddy PR, Reddy PS (2011) Reproductive endocrinology of female crustaceans: perspective and prospective. *Journal of Marine Science: Research and Development* 3: 2.
- Thongda W, Chung JS, Tsutsui N, Zmora N, and Katenta A (2015) Seasonal variations in reproductive activity of the blue crab, *Callinectes sapidus*: vitellogenin expression and levels of vitellogenin in the hemolymph during ovarian development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 179:35-43.
- Van Der Aar EM, Tan KT, Commandeur JN, Vermeulen NP (1998) Strategies to characterize the mechanisms of action and the active sites of glutathione S-transferases: a review. *Drug Metabolism Reviews* 30:569-643.
- Van Handel E (1965) Estimation of Glycogen in Small Amounts of Tissue. *Analytical Biochemistry* 11:256-65.
- Vinagre AS, Da Silva RS (1992) Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 102:579-583.
- Vinagre, A. S., and Da Silva, R. S. (2002). Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851).

- Canadian Journal of Zoology, 80:1413-1421.
- Vinagre AS, do Amaral APN, Ribarcki FP, da Silveira EF, Périco E (2007) Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 146:514-519.
- Vinagre, A. S., and Chung, J. S. (2016). Effects of starvation on energy metabolism and crustacean hyperglycemic hormone (CHH) of the Atlantic ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787). *Marine Biology* 163:3.
- Wei K, Yang J (2015) Oxidative damage of hepatopancreas induced by pollution depresses humoral immunity response in the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Fish and shellfish immunology* 43:510-519.
- Williams M.J (1981) Methods for analysis of natural diet in portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Journal of Experimental Marine Biology And Ecology* 52:103-113.
- Yazicioglu B, Reynolds J, Kozák P (2016) Different aspects of reproduction strategies in crayfish: A review. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417:33.
- Zar JH (2010) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall International, INC, Upper Saddle River, New Jersey.

Figuras e Tabelas



Figura 1. Armadilhas para a coleta de *Procambarus clarkii*. A- Lago do Parque Alfredo Volpi em São Paulo, SP, onde animais foram amostrados: B- Armadilhas utilizadas: C- Armadilhas montadas para a colet: D -Verificação das armadilhas no dia seguinte.

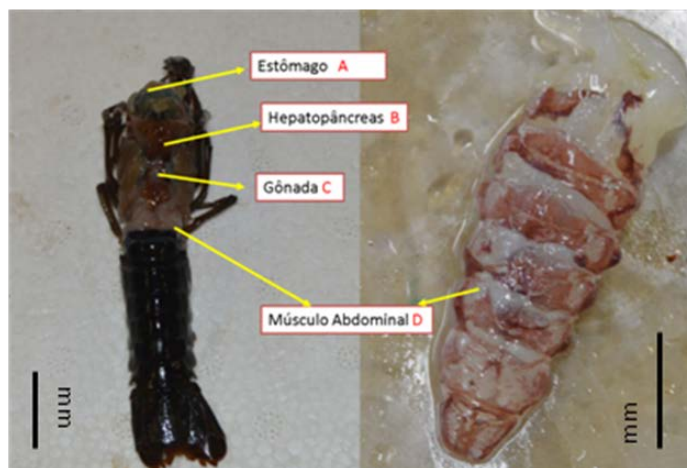


Figura 2. Tecidos utilizados: A- estômago: B- hepatopâncreas, C- gônadas (fêmeas) e D-músculo abdominal de *Procambarus clarkii*.

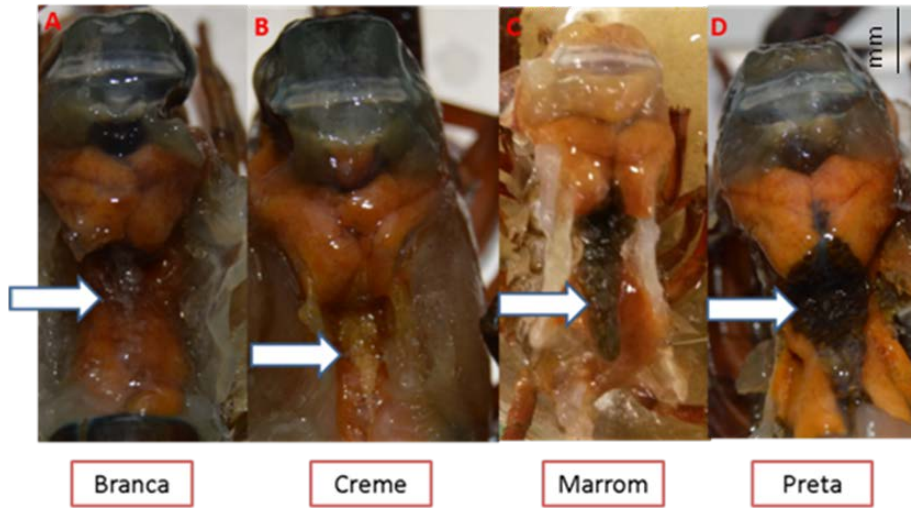


Figura 3. Maturação gonadal: A- gônada branca imatura: B-gônada creme imatura: C- gônada marrom madura: D- gônada preta madura.

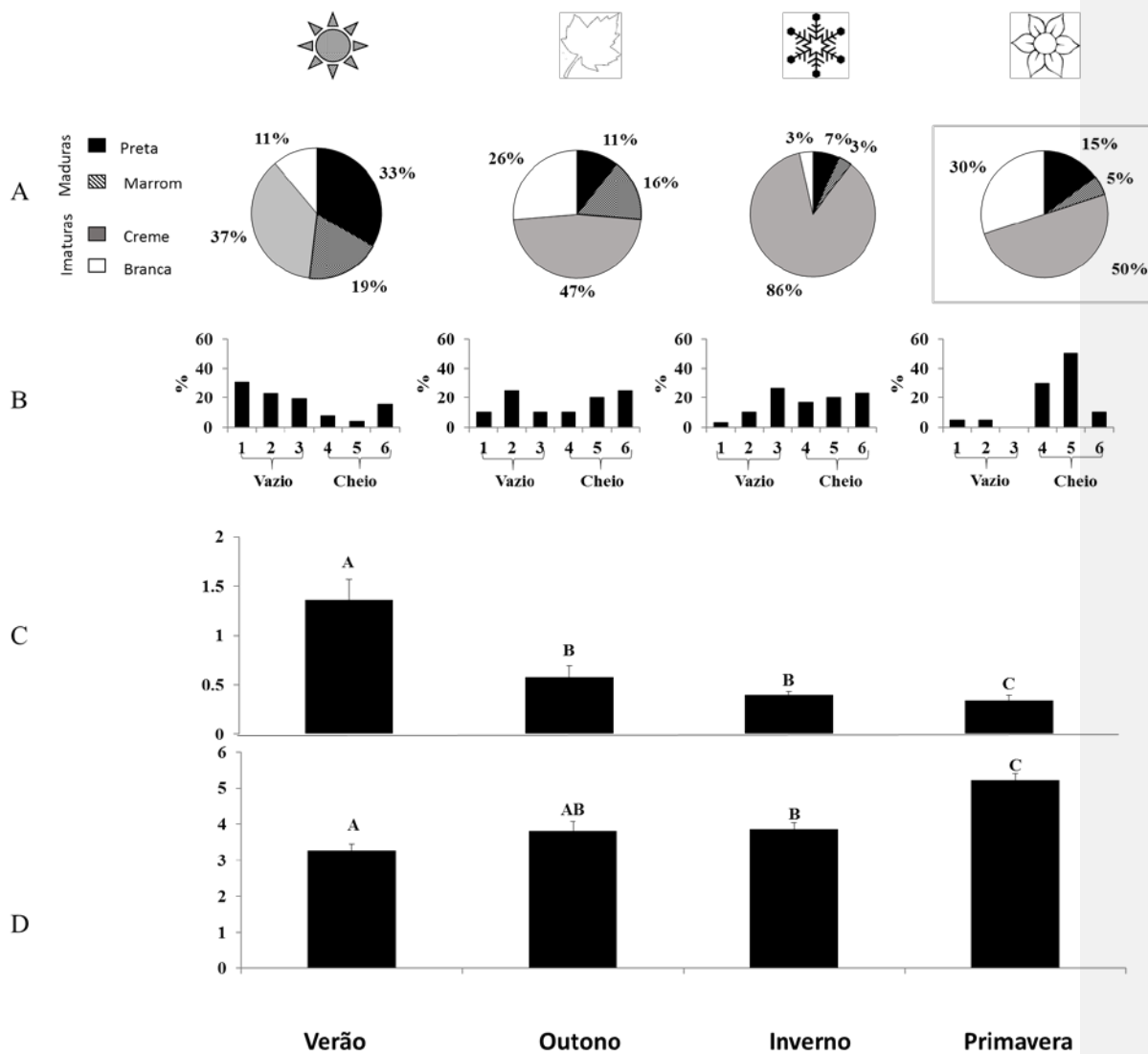


Figura 4. Maturação gonadal, grau de repleção gástrico, índice gonadosomático, índice hepatossomático de fêmeas de *Procambarus clarkii* ao longo das estações no ano 2016 no Brasil: Sol- Verão: Folha - Outono: Floco de neve - inverno: Flor - primavera: A- Maturação gonadal: B- Grau de repleção gástrico: C- índice gonadosomático: D- índice hepatossomático. Letras diferentes significam diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn $p < 0,05$).

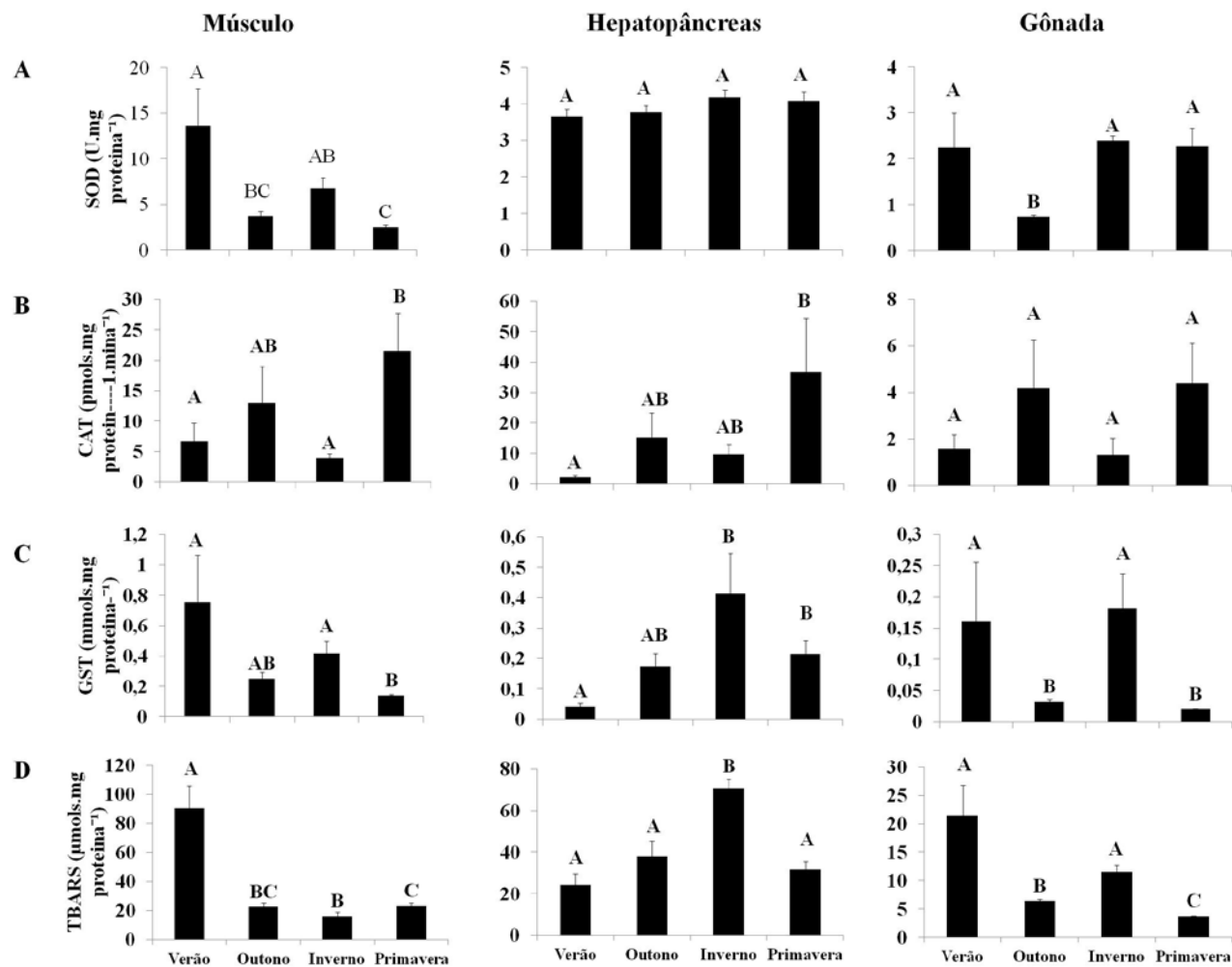


Figura 5. Atividade Enzimática e Lipoperoxidação de fêmeas de *Procambarus clarkii* ao longo das estações no ano 2016 no Brasil: A- Superóxido Dismutase; B- Catalase; C- Glutationa S-transferase; D- Lipoperoxidação. Letras diferentes significam diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn $p < 0,05$).

	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Hemolinfa				
Glicose (mg.mL ⁻¹)	18.29 ± 1.86 a	21.83 ± 2.93 a	20 ± 4.37 a	28.72 ± 3.74 a
Proteína (mg.mL ⁻¹)	45.81 ± 3.41 a	54.15 ± 8.01 a	36.87 ± 7.60 b	25.80 ± 2.95 b
Ácido úrico (mg.mL ⁻¹)	0.98 ± 0.14 a	1.22 ± 0.19 a	1.28 ± 0.13 ab	1.75 ± 0.18 b
Lipídeos (mg.mL ⁻¹)	107.75 ± 15.13 a	115.49 ± 14.14 a	106.45 ± 6.52 a	126.66 ± 13.38 a
Triglicerídeos (mg.g ⁻¹)	35.79 ± 3.91 a	40.2 ± 8.14 a	19.29 ± 2.00 b	18.78 ± 1.55 b
Colesterol (mg.mL ⁻¹)	25.74 ± 7.65 a	28.64 ± 6.08 a	15.39 ± 2.56 ab	9.08 ± 1.24 b
Colesterol VLDL (mg.mL ⁻¹)	7.15 ± 0.78 a	8.04 ± 1.62 a	3.85 ± 0.40 b	3.75 ± 0.31 b
Músculo				
Glicogênio (mg.g ⁻¹)	0.23 ± 0.05 a	0.07 ± 0.02 a	1.13 ± 0.28 b	0.93 ± 0.25 b
Proteína (mg.g ⁻¹)	50.99 ± 4.90 a	55.25 ± 13.27 a	31.51 ± 4.60 a	57.44 ± 7.70 a
Lipídeos (mg.g ⁻¹)	1.48 ± 0.25 a	2.06 ± 0.26 b	1.67 ± 0.28 ab	2.67 ± 0.16 b
Triglicerídeos (mg.g ⁻¹)	0.62 ± 0.13 a	0.0099 ± 0.0019 b	0.40 ± 0.02 a	0.15 ± 0.01 b
Colesterol (mg.g ⁻¹)	0.27 ± 0.08 a	1.94 ± 0.10 b	0.40 ± 0.05 c	0.24 ± 0.02 ac
Hepatopâncreas				
Glicogênio (mg.g ⁻¹)	0.33 ± 0.06 a	0.43 ± 0.07 a	1.55 ± 0.23 b	0.52 ± 0.08 a
Proteína (mg.g ⁻¹)	20.29 ± 5.66 a	21.49 ± 3.30 a	5.27 ± 0.60 b	34.76 ± 8.35 a
Lipídeos (mg.g ⁻¹)	17.37 ± 2.35 a	28.31 ± 5.030 a	16.87 ± 2.63 a	15.55 ± 3.94 a
Triglicerídeos (mg.g ⁻¹)	0.43 ± 0.03 a	0.07 ± 0.01 b	0.38 ± 0.04 a	0.15 ± 0.01 b
Colesterol (mg.g ⁻¹)	0.18 ± 0.03 a	1.07 ± 0.12 b	0.37 ± 0.05 c	0.38 ± 0.04 c
Gônada				
Glicogênio (mg.g ⁻¹)	0.92 ± 0.18 a	0.74 ± 0.20 a	1.07 ± 0.21 a	3.64 ± 1.14 b
Proteína (mg.g ⁻¹)	0.84 ± 0.24 a	0.76 ± 0.24 a	0.26 ± 0.08 b	0.30 ± 0.10 b
Lipídeos (mg.g ⁻¹)	11.86 ± 2.42 ab	13.39 ± 2.45 a	5.65 ± 0.70 b	20.15 ± 3.76 a
Triglicerídeos (mg.g ⁻¹)	6.44 ± 0.92 a	0.01 ± 0.0051 b	0.23 ± 0.05 c	0.10 ± 0.03 b
Colesterol (mg.g ⁻¹)	2.23 ± 0.60 a	1.82 ± 0.26 b	0.54 ± 0.24 c	0.40 ± 0.05 c

Tabela 1. Metabólitos hemolinfáticos (Glicose, Proteínas, Ácido Úrico, Lipídeos totais, Triglicerídeos, Colesterol total, Colesterol VLDL), metabólitos dos tecidos musculares, hepatopancreático e gonadal (Glicogênio, Proteínas totais, Lipídeos Totais, Triglicerídeos e Colesterol tota) de fêmeas de *Procambarus clarkii* ao longo do ciclo sazonal. Letras diferentes significam diferenças estatísticas (Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn p<0,05).

Capítulo II

ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE MACHOS REPRODUTIVOS E NÃO REPRODUTIVOS DE *Procambarus clarkii* (Girard,1852)

Será submetido a “Science of The Total Environment, Elsevier”, conceito CAPES A1 e fator de impacto 4,9.

Link para norma da revista :

<https://www.elsevier.com/journals/science-of-the-total-environment/0048-9697/guide-for-authors>

**ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE MACHOS REPRODUTIVOS E
NÃO REPRODUTIVOS DE *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) (CRUSTACEA,
CAMBARIDAE)**

Artur Antunes Navarro Valgas^a, Natália Medeiros de Albulquerque Wingen^b,
Guendalina Turcato Oliveira^{b*}, Paula Beatriz Araujo^a

^a Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Zoologia, Laboratório de Carcinologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfossiológicas, Laboratório de Fisiologia da Conservação, Porto Alegre, RS, Brasil.

***Autor Correspondente:** Guendalina Turcato Oliveira

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Departamento de Ciências Morfossiológicas, Laboratório de Fisiologia da Conservação, CEP: 90619-900, Av. Ipiranga, 6681, Prédio 12, Bloco C, sala 205 - Caixa Postal Partenon, Porto Alegre - RS, Brasil.

Endereços de e-mail: artur.valgas@acad.pucrs.br (AAN. Valgas),
natalia.wingen@acad.pucrs.br (NMA. Wingen), guendato@pucrs.br (GT. Oliveira),
pabearaujo@gmail.com (PB. Araújo).

Resumo

O uso de marcadores do metabolismo e do balanço oxidativo auxilia no entendimento da dinâmica ambiental e de como esta influencia o padrão fisiológico dos organismos. *Procambarus clarkii* é um lagostim nativo do centro sul dos Estados Unidos e nordeste do México, esta espécie apresenta dimorfismo sexual, além de dois morfotipos para os machos, sendo um reprodutivo (M1) e outro não reprodutivo (M2). Este estudo avaliou as variações sazonais de biomarcadores em machos M1 e M2, coletados no ano de 2016 no mês central de cada estação no Parque Alfredo Volpi, em São Paulo, Brasil. Amostras da hemolinfa, do hepatopâncreas e do músculo abdominal foram coletadas para a determinação de marcadores do metabolismo intermediário (glicogênio, glicose, proteínas, ácido úrico, lipídeos totais, triglicerídeos, colesterol total e colesterol VLDL), do balanço oxidativo (superóxido dismutase, catalase, glutaiona S-transferase e lipoperoxidação), além do índice hepatossomático e do grau de repleção estomacal. Os resultados evidenciam diferenças entre os morfotipos. M1 apresentou uma predominância de estômagos de médio a cheios ao longo do ano e alocação de substratos energéticos, principalmente para uso na reprodução (gametogênese e comportamentos reprodutivos), com incremento de lipoperoxidação, mesmo havendo aumento de atividade de SOD e GST. Já os M2 apresentou menor capacidade de alocação de suas reservas energéticas no período que antecede e durante a reprodução, o que pode estar associado a um menor grau de repleção gástrica, contudo M2 mantém alternância de estratégias antioxidantes que auxiliam a manutenção de níveis baixos de lipoperoxidação ao longo de todo ano no hepatopâncreas. Este padrão observado para o grau de repleção gástrica parece indicar uma competição intraespecífica entre as categorias de machos, o que aliado ao perfil de uso das reservas energéticas parece ser determinante para que os M2 alcancem competência para reproduzirem.

Palavras Chave

Lagostim vermelho: Metabolismo Intermediário: Balanço oxidativo: Repleção

Gástrica: Reprodução: Morfotipos

Abreviaturas

M1, Machos reprodutivos: M2, machos não-reprodutivos: TGL, triglicerídeos: LT, lipídeos totais: PT, proteínas totais: GG, glicogênio: SOD, superóxido dismutase: EROs, espécies reativas de oxigênio, CAT, catalase: GST, glutaiona-S-transferase: LPO, lipoperoxidação: EROs, espécies reativas de oxigênio: ICMBIO, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade: PUCRS, Pontifícia Universidade Católica

do Rio grande do Sul: RS, Rio Grande do Sul: SP, São Paulo.

1.Introdução

As variações no ambiente influenciam na fisiologia e no *fitness* dos animais, regendo períodos de maior ou menor vulnerabilidade a estressores ambientais, sejam naturais ou antropogênicos. Em crustáceos, variações ciclo-anuais de temperatura, fotoperíodo, salinidade, umidade, oxigênio, pH, entre outros, influenciam períodos reprodutivos, crescimento e períodos de menor ou maior atividade (Silva-Castiglioni et al., 2012; Pinheiro and Oliveira 2016).

A glicose é o principal monossacarídeo circulante na hemolinfa de crustáceos, sendo usada para síntese de mucopolissacarídeos, quitina, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), glicogênio e formação de piruvato (Chang and O'Connor, 1983; Jimenez and Kinsey, 2015). A glicose na hemolinfa provem da absorção direta da dieta, através de células epiteliais hepatopancreáticas e intestinais ou de tecidos periféricos, como o hepatopâncreas e o músculo, onde é armazenada como glicogênio ou sintetizado pela via gliconeogênica (Oliveira e da Silva, 1997; Verri et al., 2001). A mobilização deste monossacarídeo na hemolinfa está intimamente associada a variáveis bióticas e abióticas, incluindo estágio de muda, dieta, estado nutricional, sazonalidade, salinidade, oxigênio dissolvido, entre outros (Jimenez and Kinsey, 2015).

Os lipídeos desempenham um papel importante como constituintes das membranas e no metabolismo de crustáceos, sendo uma importante fonte de energia nestes animais. Na maioria dos crustáceos os triglicerídeos são a principal forma de armazenamento de lipídeos, sendo o hepatopâncreas o principal sítio desta estocagem

(Chang and O'Conner 1983). Já os aminoácidos são encontrados em altas concentrações na forma livre ou como constituintes de proteínas, sendo o músculo o principal sítio de sua estocagem (Jimenez and Kinsey, 2015).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), é parte integrante do metabolismo dos organismos aeróbios, sendo observada em diversas condições fisiológicas. Estas espécies reativas, produzidas especialmente nas mitocôndrias e peróxissoma (Blier et al., 2001), têm importantes funções biológicas, como por exemplo: na fagocitose, para eliminar um agente agressor, no controle da pressão arterial, na sinalização celular, na fertilização de ovos, na oxidação de agentes químicos xeno ou endobióticos, entre outros (Apel and Hirt 2004; Costantini, 2014). As EROs são moléculas com fortes propriedades oxidativas, podem causar danos a constituintes celulares em altas concentrações (Martínez-Cayuela, 1999; Gil-del Valle et al., 1999). A fim de metabolizar e evitar os danos causados pelas EROs, os organismos desenvolveram um sistema antioxidante, o qual é constituído por um componente enzimático e outro não enzimático que se complementam (Lesser 2006; Stegeman et al., 1992; Schlenk and Di Giulio 2002; Sies, 1991; Nappi a and Dttaviani 2000). Dentre as enzimas antioxidantes melhores estudadas, encontram-se a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT) e Glutaciona Peroxidase (GPx).

Além do sistema antioxidante, destaca-se o sistema de biotransformação que previne a formação de EROs, atuando sobre moléculas endo e xenobióticas a fim de tornarem estas moléculas mais polares, aumentarem seu peso molecular e tamanho facilitando a sua excreção (Dantzer et al. 2014). A família das glutacionas S-transferases (GST) atua conjugando moléculas de glutaciona a substratos endógenos ou exógenos tornando-as mais facilmente excretáveis, diminuindo seu tempo de permanência no organismo e conseqüentemente sua toxicidade (Richardson et al. 2010). Esta família

multifuncional de enzimas desempenha também, diversos papéis fisiológicos nos organismos aeróbios tais como, o sequestro e o transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteroides, hemebilirubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (de Freitas et al. 2008).

O uso de biomarcadores metabólicos e do balanço oxidativo ajuda no entendimento das dinâmicas do ambiente e como elas influenciam a fisiologia dos animais ao longo do ano. Com isso, são importantes ferramentas para biologia da conservação, pois trazem informações sobre períodos de maior ou menor suscetibilidade dos organismos em ambiente natural, assim como auxiliam a traçar estratégias de manejo para espécies invasoras (Beaulieu et al., 2014, Madliger et al., 2016).

Procambarus clarkii (Girard, 1852) é um lagostim da família Cambaridae, com área nativa de ocorrência no centro sul dos Estados Unidos e nordeste do México e que atualmente foi introduzida em muitos países (Loureiro et al., 2015ab). Essa espécie tem alta plasticidade e fecundidade com desenvolvimento, crescimento e maturação sexual rápidos (Bissattini et al., 2015; Bush et al., 2016; Goretti et al., 2016; Momot, 1995; Powell and Watts., 2010; Peruzza et al., 2015; Suko, 1956), conferindo a ela capacidade de estabelecer populações onde foi introduzida (Loureiro et al., 2015a). Ela é considerada uma espécie invasora e estudos mostram que sua introdução está relacionada à diminuição e a extinção de diversas populações de artrópodes e anfíbios (Cruz et al., 2008) e diversos impactos econômicos (Loureiro et al., 2015b).

Procambarus clarkii é um animal que apresenta um claro dimorfismo sexual, sendo que em machos há a diferenciação em adultos reprodutivos (M1) e adultos não

reprodutivos (M2) descritos por Taketomi et al. (1990). Os machos M1 apresentam os dois primeiros pares de pleópodes bem desenvolvidos e muito calcificados, adaptados como órgãos copuladores, apresentam ganchos copuladores no terceiro e quarto isquiopodito e os quelípodos são desenvolvidos. Os machos M2 apresentam os dois primeiros pares de pleópodes desenvolvidos, porém pouco calcificados, não apresentam ganchos copuladores nos isquiopodito e os quelípodos são menos desenvolvidos quando comparados aos do M1. Ambas as categorias de machos estão presentes nas populações o ano todo e os machos podem alternar entre uma forma e outra ao longo de ciclo de vida (Yazicioglu et al., 2016). Alguns estudos atribuem a transição de M2 para M1 ao hormônio peptídico produzido pela glândula androgênica e ao hormônio terpenóide, metilfarnesoato, produzido no órgão mandibular. Ambos têm sido relacionados com o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e incremento de comportamentos agressivos agonísticos em lagostins (Laufer et al., 2005; Taketomi et al., 1990,1996).

Pouco se sabe sobre capacidade metabólica e o balanço oxidativo de machos reprodutivos e não reprodutivos em ambiente natural. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar como se comportam ao longo de um ciclo sazonal alguns parâmetros ligados ao metabolismo intermediário e ao balanço oxidativo em machos reprodutivos e não reprodutivos de *Procambarus clarkii*, e como estes se relacionam com estes morfotipos.

2. Material e Métodos

2.1 Coletas dos Animais

Foram coletados 147 indivíduos adultos de *Procambarus clarkii* ao longo do ano de 2016, sendo 81 machos reprodutivos (Verão= 28: Outono=20: Inverno=13: Primavera=20) e 66 machos não reprodutivos (Verão= 19: Outono=8: Inverno=20:

Primavera=19) no Parque Municipal Alfredo Volpi na Cidade de São Paula-SP, Brasil (23°35'16"S 46°42'09"W). No momento da colocação e retirada das armadilhas foram verificados os níveis de oxigênio dissolvido e a temperatura da água, através do uso de um oxímetro digital de campo (Lutron DO-5519), o pH foi determinado com uso de kit comercial (Labcon Test pH tropical). Os dados meteorológicos de temperatura do ar e precipitação foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), através da estação meteorológica Mirante em São Paulo (23°30'S 46°37'W) que se situa na região de coleta dos animais.

Para a captura dos animais foi utilizada armadilha com atrativo de ração de gatos, sabor peixe, acondicionada em um recipiente furado que permitia a liberação de pistas químicas, mas impedia os animais de ingerirem a ração. Os animais foram pesados com uso de pesola de 30g (precisão de 0,25g) e as amostras de hemolinfa foram coletadas com uso de seringas de insulina contendo oxalato de potássio (10%), como anticoagulante. Após, os animais foram crioeutanasiados. O músculo abdominal, hepatopâncreas e estômago foram removidos em campo sob banho de gelo, congelados em freezer e transportados em caixas térmicas até o Laboratório de Fisiologia da Conservação, na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre, RS. No laboratório, as amostras foram acondicionadas em freezer a -20 °C até o momento das dosagens como padronizado por Pinheiro e Oliveira (2016).

. As licenças para as coletas foram obtidas junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (Licenças de números: 45775152 e 36548762). Os animais foram pesados com uso de pesola de 30g (precisão de 0,25g) e medidos comprimento da margem anterior do rostro até a margem posterior do tálson com uso de paquímetro digital (precisão de 0,01mm).

2.2 Grau de repleção gástrico

Os estômagos foram categorizados com base na quantidade de alimento presente seguindo uma escala proposta por Willians (1981) e utilizada também por Silva-Castiglioni et al (2016), a qual contém 6 classes descritas a seguir:

Classe 1 = 0% - vazio:

Classe 2 = < 5% - parcialmente vazio:

Classe 3 = 5 a 35% - vazio/ médio:

Classe 4 = 35 a 65% - médio:

Classe 5 = 65 a 95% - médio/ cheio:

Classe 6 = > 95% - cheio.

2.3 Índice Hepatosomático

Determinado pela equação proposta por Grant and Tyler (1983):

$$IH = (Mh/Mt) \cdot 100$$

Onde Mh= Massa do hepatopâncreas e Mt= Massa total do indivíduo.

2.4 Metabolismo

Os marcadores de metabolismo do plasma (glicose, proteínas totais, ácido úrico, triglicerídeos e colesterol total) foram quantificados por espectrofotometria através do uso de kits comerciais da Biotécnica Indústria e Comércio Ltda (BioTécnica: Biotecnologia Avançada). Os lipídeos totais foram medidos pelo método da

sulfosfosvanilina (Frings and Dunn 1970) e o colesterol VLDL foi obtido por uso de uma relação TGL/5, onde TGL é o valor de triglicerídeos circulantes na hemolinfa (Friedwald et al.,1972). Estes parâmetros foram determinados em triplicata e expressos em mg/dl de plasma.

As análises bioquímicas dos metabólitos teciduais foram feitas por meio de espectrofotometria, em duplicata, com os resultados expressos em mg/g de peso úmido. O glicogênio foi extraído (Van Handel.,1965) e quantificado como glicose após hidrólise ácida (HCl) e neutralização (Na₂CO₃), utilizando-se o kit comercial baseado no método da glicose oxidase da BioTécnica: Biotecnologia Avançada . Os níveis de proteínas totais foram medidos (kit da BioTécnica: Biotecnologia Avançada), com reação de íons cobre (Cu⁺²) com as ligações peptídicas das proteínas séricas, em meio de alcalino (Reagente de Biureto). Os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Folch et al., (1957) medidos pelo método da sulfosfosvanilina (Frings and Dunn 1970). Os triglicerídeos e o colesterol total foram extraídos (Folch et al., 1957) e quantificados por kits de espectrofotometria BioTécnica: Biotecnologia Avançada.

2.5 Balanço oxidativo

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato (20 mM) com de cloreto de potássio (140 mM) e de fenilmetilsufonil fluorido, um inibidor de proteases (1 mM), em uma proporção 5ml:1g com uso de ultra-turrax (Pinheiro and Oliveira., 2016). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 1000g, por 10min, em 4 °C, o sobrenadante desta centrifugação foi coletado, aliquotado e congelado a -20°C, para posterior análise do balanço redox (Pinheiro and Oliveira., 2016).

A superóxido dismutase (SOD) foi detectada por espectrofotometria a 480nm e expressa em U.mg proteína⁻¹. (Boveris and Cadenas1982). A atividade da enzima

antioxidante Catalase (CAT) foi quantificada pelo decaimento do peróxido de hidrogênio da amostra, detectado a 240nm e expressa em $\mu\text{mols.mg proteína}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Boveris and Chance1973). A Glutathione S-Transferase (GST) foi mensurada pela conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB), com redução da atividade da glutathione (GSH), detectado em 340nm e expressa em $\text{mmols. mg proteína}^{-1}$ (Habig et al. 1981). Os níveis de lipoperoxidação (LPO) foram quantificados por meio da detecção das substâncias reativas ao ácido Triobarbitúrico (TBARS), que são detectados em 520nm e expresso em $\mu\text{mols.mg proteína}^{-1}$ (Lima and Abdalla 2001).

2.6 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados pelos programas estatísticos SPSS 20.0 e Bioestat 5.0, através do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Para comparação dos dados bioquímicos entre as estações do ano, para cada categoria reprodutiva, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do complementar de Dunn, e nível de significância de 95%. Para comparação dos resultados referentes a comprimento e massa corporal foi empregado o teste t. Para comparação das curvas obtidas ao longo do ano para os morfotipos M1 e M2 foi utilizado o teste de Friedman, sendo considerado com nível de significância de 95% (Zar 2010).

3. Resultados

3.1 Fatores Abióticos

Observou-se uma diminuição da temperatura do ar, da água e da precipitação no inverno. Os níveis de oxigênio e o pH da água se mantiveram constantes ao longo do ano (Material suplementar).

3.2 Parâmetros Morfométricos

Não foi observada diferença em relação ao comprimento total de M1 e M2, mas M1 apresentou maior massa que M2 (Tabela 1). Com relação ao grau de repleção gástrica, foi observado para M1 predominância de estômagos nas categorias de médio a cheio (4 a 6) no verão 67%, no outono 65%, no inverno 69% e na primavera 95%. Já para M2 foi observado estômagos entre as categorias de 4 até 6 (de médio a cheios) no verão 52%, no outono 50%, no inverno 80% e na primavera 47%. (Fig. 1). Ambas as categorias de machos apresentaram variações significativas do índice hepatossomático. Quando comparado o comportamento desta variável (IH) ao longo do ano, observou-se que os machos reprodutivos aumentam gradualmente o índice hepatossomático a partir do outono até atingir valores máximos na primavera. Os M2 apresentam um incremento desta variável no outono e depois na primavera (Fig. 1).

3.3 Metabolismo

A comparação dos resultados obtidos para M1 e M2 ao longo do ano mostrou uma diferença intermorfológica em todos os metabólitos estudados.

3.3.1 Metabólitos Hemolinfáticos

Para os machos M1 observou-se ao longo do ano, a manutenção dos níveis glicêmicos ($p > 0,05$), um pico de proteínas totais no verão seguido de uma redução destas até a primavera e incremento do ácido úrico na primavera. Os lipídeos totais apresentaram uma redução no inverno, seguida de incremento na primavera. Já os triglicérides e o colesterol VLDL, não apresentaram diferenças significativas, enquanto que o colesterol total teve uma diminuição na primavera (Tabela 2).

Em relação ao morfotipo M2, houve uma diminuição da glicose circulante no inverno, as proteínas totais apresentaram as maiores concentrações no outono com posterior diminuição no inverno e na primavera e os níveis de ácido úrico diminuíram no outono, aumentaram no inverno, tiveram um pico deste metabólito na primavera. Os lipídeos totais apresentaram suas maiores concentrações no verão e na primavera. Os triglicerídeos e o colesterol VLDL apresentaram os menores valores no inverno, e o colesterol total, na primavera (Tabela 2).

3.3.2 Metabólitos Teciduais

O morfotipo M1 apresentou em seu músculo abdominal um pico de suas reservas de glicogênio na primavera, de proteínas totais no outono, de lipídeos totais na primavera, de triglicerídeos no verão e de colesterol total no inverno (Tabela 3). No hepatopâncreas, houve maiores estoques de glicogênio no inverno, de proteínas totais e lipídeos totais no outono, de triglicerídeos no verão e colesterol total apresenta menores níveis no verão (Tabela 2).

Para M2, observou-se no músculo uma diminuição dos níveis de glicogênio no outono, com posterior aumento no inverno e na primavera. As proteínas totais tiveram um pico de sua concentração no verão e no inverno. Os níveis de lipídeos totais apresentaram um aumento no verão, os triglicerídeos diminuíram no outono e na primavera, e os níveis de colesterol total aumentaram no outono. No hepatopâncreas, houve maiores níveis de glicogênio no inverno, manutenção dos níveis proteicos ao longo de todo ano ($p>0,05$) e incremento dos lipídeos totais, os triglicerídeos e o colesterol total no verão (Tabela 2).

3.4 Balanços Oxidativo

M1 e M2 apresentaram diferença intermorfológica em todos os parâmetros do balanço oxidativo estudados ao longo do ano.

Observou-se no músculo de M1, atividade da SOD no verão com diminuição nas demais estações do ano. A atividade de CAT apresentou um pico no outono e na primavera. A GST teve maior nível de atividade no verão, seguido de uma redução gradual até a primavera. Os níveis de LPO foram maiores no verão, com diminuição gradual até o inverno (Fig.2). No hepatopâncreas, houve redução da atividade da SOD na primavera. A CAT apresentou aumento da atividade no outono e na primavera. A GST mostra uma redução de sua atividade no verão e os níveis de LPO apresentaram aumento no outono (Fig.3).

No músculo dos M2 observou-se, uma baixa atividade da SOD na primavera. A atividade da CAT apresentou incremento da atividade no outono e na primavera e a GST teve maior atividade no verão, com uma redução gradual até a primavera. Os níveis de LPO foram maiores no verão com diminuição gradual até o inverno (Fig.2). O hepatopâncreas apresentou maior atividade da SOD no verão e no inverno, a CAT apresentou incremento de sua atividade na primavera e a GST, no outono e no inverno. Os níveis de LPO se mantiveram constantes ao longo de todas as estações do ano ($p>0,05$) (Fig.3).

4. Discussão

O presente estudo é o primeiro a descrever um padrão de variação sazonal para marcadores do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo de machos adultos reprodutivos (M1) e não reprodutivos (M2) de uma população do lagostim *Procambarus clarkii*, em uma área de distribuição não natural da espécie. Ambas formas não apresentaram diferença em relação ao comprimento, mas diferem em massa

corporal, com M1 apresentando um maior grau de quitinização do exoesqueleto e quelípodos maiores, conferindo assim maior massa que M2, o que também foi observado por Taketomi et al. (1990). Essa diferença em massa corporal pode estar ligada à condição reprodutiva e não reprodutiva e em consequência, as diferenças bioquímico-fisiológicas.

Os M1 apresentam maior atividade alimentar durante a primavera com 90% de estômagos 4 a 6 (médio a cheio), que pode estar relacionada a abundância de larvas e estágios juvenis de dípteros, (Wilke et al., 2017) e outros grupos nesse período no Parque Alfredo Volpi: como consequência esses estômagos cheios levaram a estocagem de substratos energéticos, principalmente no hepatopâncreas, para uso durante o pico reprodutivo no verão . Tal padrão é suportado pelo incremento do IH na primavera e sua subsequente diminuição no verão, o que reflete uma possível alocação das reservas energéticos do hepatopâncreas durante a reprodução, tal padrão de estocagem que antecede o período reprodutivo foi também registrado para outros decápodes (Brodie et al., 2017; Silva-Castiglioni et al., 2016), e outros lagostins (Silva-Castiglioni et al., 2012).

Em M2 os menores graus de repleção gástrica encontram-se no outono, quando M1 apresenta grau alto. Já foi observado que machos não reprodutivos foram impedidos de acessar o alimento por machos reprodutivos e fêmeas após a estação reprodutiva (Zizzari et al., 2016). Em *P.clarkii* no sudeste do Brasil poderia estar ocorrendo fenômeno semelhante, já que as fêmeas também apresentam altos graus de repleção gástrica depois da reprodução (Valgas, 2018). No inverno o morfotipo M2 apresenta uma maior quantidade de estômagos nas categorias de 4 a 6 (80%), enquanto que M1 apresenta 69% e as fêmeas 60% (Valgas, 2018), indicando uma menor competição intraespecífica. Observou-se aumento no outono e na primavera de IH em M2, quando

também é observado para esse morfotipo maiores estoques de glicogênio no hepatopâncreas. Essa estocagem indica uma preferência no uso de gorduras e proteínas: como mencionado para lagostins nativos por Silva-Castiglioni et al. (2012).

A manutenção da glicose circulante em M1 se deve possivelmente, a atividade alimentar constante, cuja predominância de estômagos nas categorias 4 a 6. M2 apresentou diminuição da glicose circulante no inverno, o que coincide com a única estação do ano onde se observou a predominância (80%) de estômagos de médio até cheios (4-6) e um incremento dos níveis de glicogênio no hepatopâncreas. Tais resultados nos permitem sugerir um aumento da captação de glicose por este órgão, conduzindo a um incremento da glicogênese com conseqüente aumento deste polissacarídeo, Oliveira and da Silva (1997), utilizando carbono marcado observaram que o caranguejo *Neohelice granulata* submetido a diferentes dietas, faz uso de glicose circulante na glicogênese hepatopancreática, o que reforça nossa hipótese.

A diminuição de proteínas na hemolinfa em M1 durante o outono está relacionada à possível captação deste metabólito pelos tecidos. Nesta estação as proteicas no músculo e no hepatopâncreas encontram-se altas, restabelecendo os estoques de proteínas que haviam sido utilizados durante a estação reprodutiva (verão). Padrão semelhante foi verificado por Oliveira et al. (2007) estudando variação sazonal em *Aegla platensis*. Todavia, no inverno e na primavera há uma diminuição mais intensa do que observada no outono. O catabolismo deste substrato e a liberação, possivelmente, de aminoácidos gliconeogênicos, podem estar envolvidos. Esses aminoácidos poderão por sua vez serem utilizados na síntese de glicose auxiliando assim, na manutenção da glicemia e na síntese de glicogênio tecidual, visto que há aumento das reservas de glicogênio nos tecidos, principalmente no músculo. Jimenez and Kinsey (2015) em sua revisão mostram uso de aminoácidos em vias

gliconeogênicas e glicogênicas em crustáceos. O aumento do ácido úrico circulante reforça a hipótese do catabolismo proteico, lembrando que este metabólito é sintetizado a partir do nitrogênio proveniente do catabolismo de proteínas, como relatado por Weihrauch et al. (2017).

Ao contrário de M1 o pico de proteínas circulantes em M2 é no outono, quando há também predominância de estômagos vazios e diminuição das proteínas musculares indicam um catabolismo destas e a liberação deste substrato na hemolinfa, para possível uso nas vias gliconeogênicas e/ou na produção de ATP, como observado por Oliveira and da Silva. (1997) no caranguejo estuarino *Neohelice granulata* em experimento de dieta. Com relação ao ácido úrico em M2, observaram-se os menores níveis circulantes no outono, em contra ponto aos maiores níveis hemolinfáticos de proteínas. O ácido úrico aumenta progressivamente nas estações subsequentes (inverno e primavera), coincidindo com a diminuição de proteínas nestas estações na hemolinfa. Esse padrão indica uma captação e metabolização das proteínas circulantes nos tecidos, com consequente produção de ácido úrico a partir de subprodutos nitrogenados gerados na degradação de proteínas como demonstrado por Weihrauch et al. (2017).

Os lipídeos totais na hemolinfa apresentaram uma diminuição no inverno para M1 que, como reportado por Jimenez and Kinsey (2015) pode indicar o uso deste substrato energético nesta estação em vias aeróbicas para síntese de ATP. Na estação subsequente, há um pico de lipídeos circulantes que coincide com a maior atividade alimentar de M1. A alocação deste substrato a partir do trato gastrointestinal para a hemolinfa foi demonstrado por Silva-Castiglioni et al. (2016) em *Aegla platensis* submetidos a períodos de jejum e realimentação. Em M2 os lipídeos totais mais baixos encontram-se no outono e inverno. Eles podem estar sendo alocados para o crescimento,

como observado no siri *Portunus trituberculatus* (Han et al., 2017).

Os triglicerídeos e colesterol VLDL na hemolinfa não se alteram ao longo do ano em M1. Como em crustáceos os triglicerídeos são a principal fonte de substrato para síntese de ATP (Jimenez and Kinsey, 2015), no presente estudo aparentemente o colesterol VLDL carrega os triglicerídeos do trato gastrointestinal para os tecidos, já que os estômagos permaneceram de médio a cheios durante todo o ano. Em M2 a diminuição dos triglicerídeos na hemolinfa e incremento das reservas nos tecidos no inverno indica uma passagem direta do trato gastrointestinal para os diferentes tecidos. A vantagem de estocar triglicerídeos é que como são hidrofóbicos, o organismo pode estocá-los de forma anidra (Nelson et al. 2014). Vinagre and Da Silva (1993) demonstraram que até 20% da massa do hepatopâncreas do caranguejo *Neohelice granulata* é constituída por gorduras. Na primavera os níveis circulantes de triglicerídeos se mantêm baixos, e insuficientes, havendo a depleção das reservas teciduais.

A diminuição de colesterol total circulante na primavera em M1 pode estar relacionada ao seu uso na síntese de hormônios sexuais na estação que antecede o pico reprodutivo da espécie, como já sugerido por diferentes autores para diferentes crustáceos decápodes (Lafont and Mathieu 2007; Kumar et al., 2018; Buckup et al., 2008; Vinagre et al., 2007; Silva-Castiglioni et al., 2007 e 2012; Musin et al., 2017). Em M2, houve a depleção deste metabólito no inverno, o que se pode associar ao uso deste metabólito para a síntese de ecdiesteróides e composição de membranas celulares, como já constatado por Jimenez and Kinsey (2015) e Fanjul-Moles et al. (2012).

As reservas de glicogênio no músculo de M1 aumentam no inverno e na

primavera. No inverno há indicação do uso de aminoácidos em vias gliconeogênicas, uma vez que há a diminuição de proteínas circulantes e teciduais nesta estação. Resposta semelhante foi observada por Oliveira and da Silva (1997) para o caranguejo estuarino *N. granulata*. Na primavera, parece estar diretamente relacionado com a maior ingesta de alimentos. Uma relação direta entre os níveis de glicogênio e o grau de repleção gástrico também foi observado por Silva-Castiglioni et al. (2016) para *Aegla platensis* submetida a diferentes períodos de jejum, o aumento de glicogênio nesta estação também foi observado por Pinheiro (2015) e Vinagre et al (2007) analisando as variações sazonais do metabolismo intermediário do lagostim *Parastacus brasiliensis promatensis* e caranguejo *Ocypode quadrata*. As reservas de glicogênio aumentam no hepatopâncreas em períodos que antecedem a atividade reprodutiva (Antunes et al., 2010), no caso de *P.clarkii* isto ocorreu no inverno, quando também o grau de repleção estomacal foi de médio a cheio.

As reservas de glicogênio no músculo de M2 diminuem no outono, quando também há menor atividade alimentar, como já mencionado anteriormente. Essa diminuição na ingesta pode ter relação com competição intraespecífica. Copp (1986) verificou a ocorrência de hierarquia entre os machos de *Procambarus clarkii*, havendo uma dominância dos M1 sobre M2 e desta forma os impedindo de se alimentar. O aumento do estoque de glicogênio muscular (inverno e primavera) e hepatopancreático (inverno) pode estar relacionado a uma maior atividade alimentar. O aumento dos estoques de glicogênio no hepatopâncreas durante o inverno e na primavera no músculo também foram relatados em trabalhos com *O. quadrata* (Antunes et al., 2010; Vinagre et al., 2007).

A redução do estoque de proteína muscular durante o inverno e primavera em M1 parece estar associada com a utilização deste substrato energético para síntese de

glicogênio e/ou ATP, com a consequente formação de ácido úrico, o qual se encontra alto nesse período. No hepatopâncreas, há o aumento de proteínas no outono, que parece estar relacionado com maior captação de aminoácidos por este tecido, levando a diminuição das proteínas circulantes na hemolinfa após o período reprodutivo. Padrão similar foi relatado por Dutra et al. (2008) em estudo com *P. brasiliensis*.

A diminuição das reservas proteicas no músculo de M2 coincide com os períodos de menor grau de repleção gástrica no outono. Isto pode estar associado a interações agosnísticas hierárquicas na disputa por alimento com os machos reprodutivos (M1), como também já observado por outros autores para a espécie (Figler et al., 2005; Horner et al., 2008; Issa et al., 1999). No hepatopâncreas não há variação nos níveis proteicos, o que evidencia o músculo como a principal reserva de proteínas para o organismo, fato já relatado para crustáceos por Musin et al. (2017) e Jimenez and Kinsey (2015).

A alocação de lipídeos no músculo tem padrão semelhante ao observado no glicogênio, com a transferência de substratos energéticos provinda diretamente da dieta. Em M1 os lipídeos totais tiveram um aumento durante a primavera, quando possivelmente a dieta era rica em proteínas e gorduras provinda de artrópodes (Wilke et al., 2017). Com relação ao hepatopâncreas, existe um aumento das reservas de lipídeos após o término do pico reprodutivo (outono). Como Oliveira et al. (2007) e Jimenez and Kinsey (2015) sugerem, há uma realocação das reservas lipídicas para o hepatopâncreas, já que este é o principal sítio de reservas de triglicerídeos.

Em M2, há um pico de reservas lipídicas musculares e hepatopancreáticas no verão, isto pode estar relacionado a uma alimentação mais rica em gorduras, (náíades, larvas de insetos e raízes), como visto por outros autores para *Procambarus*

(Gutiérrez-Yurrita et al., 1998; Davis et al., 1986). A alimentação rica em ácidos graxos e proteínas acelera o crescimento de juvenis de *P.clarkii* (Oliveira and Fabião 1998) o que poderia favorecer os M2 e torná-los aptos à reprodução na estação subsequente.

A estocagem de triglicerídeos durante o verão no músculo e hepatopâncreas de M1, revela uma preferência ao uso de carboidratos para sustentar as atividades ligadas à reprodução. No hepatopâncreas o aumento desta reserva no inverno, nos permite sugerir um preparo para o próximo ciclo reprodutivo, como apontado por Jimenez and Kinsey (2015) para crustáceos. Os M1 parecem utilizar triglicerídeos no início da reprodução, pois é um momento de grande gasto energético na produção de gametas. Durante o pico reprodutivo passam a estocar triglicerídeos e a utilizarem as reservas de carboidratos para sustentar os eventos reprodutivos. O incremento de triglicerídeos no verão e no inverno em todos os tecidos de M2 pode estar associado, com comportamento alimentar com preferência por alimentos gordurosos, pois temos predominância de estômagos cheios e aumento de todas de gordura.

Os níveis de colesterol total nos tecidos de M1 apresentam aumento durante as estações que antecedem e sucedem os períodos de maior atividade reprodutiva. Como sugerido por Jimenez and Kinsey (2015) níveis altos de colesterol podem estar associados a processos de síntese de hormônios sexuais e ecdiesteróides. Foi observado em M2 um pico de colesterol durante o outono. Contudo, no hepatopâncreas houve a diminuição deste no inverno, podendo estar associado ao processo de muda. O colesterol é um importante componente da estrutura de membranas celulares e é substrato para a síntese de hormônios ecdiesteróides, sendo assim fundamental durante os períodos de maior investimento em crescimento como sugerido por Gu et al.(2017) em trabalho com *Macrobrachium nipponense*.

O maior nível de lipoperoxidação e de atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione S-transferase no músculo durante o verão em M1, parece estar relacionado ao estresse gerado pela reprodução, quando estes animais tem aumento da taxa metabólica, por terem que lidar com o aumento da procura por parceiras reprodutivas e disputas agonísticas por território (Daws et al., 2002; Figler et al., 1995). Todavia, o aumento da atividade da SOD e GST não foi o suficiente para prevenir o dano oxidativo, havendo baixa atividade de CAT e possivelmente dano por peróxido de hidrogênio provindo da dismutação do ânion superóxido pela SOD. Em *Parastacus brasiliensis promatensis* também há aumento da atividade de SOD e GST e incremento de lipoperoxidação, com diminuição de CAT (Pinheiro and Oliveira 2016). A maior atividade de CAT nos meses de outono parece estar relacionada com a maior atividade alimentar pós-reprodução, pela alta metabolização de substratos energéticos. Na primavera, a CAT alta é importante, pois é o período que antecede a reprodução, pois ela atua prevenindo danos oxidativos gerados pela maior demanda energética (Peng et al., 2010).

O incremento da atividade da CAT, da GST e dos níveis de lipoperoxidação no hepatopâncreas durante o outono em M1, pode indicar uma maior atividade metabólica deste órgão, principalmente relacionado à síntese de reservas energéticas (glicogênio, proteínas e lipídeos), como verificado em *Parastacus* por Silva-Castiglioni et al. (2012) e Pinheiro and Oliveira (2016). Na primavera, há uma diminuição da atividade da SOD e aumento da CAT sugerindo uma alternância no sistema SOD/CAT, a fim de reduzir o gasto energético: como sugerido por Fanjul-Moles et al. (2012) em sua revisão de estresse oxidativo em crustáceos.

A diminuição da atividade de SOD e GST no músculo de M2 ocorre juntamente com os menores níveis de lipoperoxidação, na primavera. A CAT, neste tecido,

apresenta maior atividade durante o outono. Isso pode estar associado a eventos de crescimento, quando a maior atividade tecidual durante a ecdise gera uma maior formação de peróxidos de hidrogênio, com a CAT atuando prevenindo danos oxidativos durante esse período de maior suscetibilidade, como sugerido por Salaenoi et al.(2014) em estudo com *Scylla serrata*. No hepatopâncreas não se observaram variações no nível de lipoperoxidação, possivelmente associado, a uma alternância das estratégias de defesas antioxidantes com maior atividade do sistema SOD, no verão, CAT/ GST no outono e SOD/ GST inverno. Já na primavera, há maior atividade da CAT e maiores níveis circulantes do ácido úrico, um antioxidante não enzimático. A GST atua sob subprodutos de vias metabólicas conjugando-os a molécula de glutathiona (GSH), e tornando assim menos tóxicos e de mais fácil excreção, evitando desta forma a formação de EROs (Harayashiki et al., 2016).

Observou-se uma clara distinção no perfil de variação sazonal do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo entre os morfotipos M1 e M2. Além disto, M1 apresenta maior predominância de estômagos cheios durante todo o ciclo anual estudado, como também, uma maior e mais efetiva alocação de substratos energéticos a fim de manter a atividade reprodutiva. Por outro lado, M2 apresenta menor capacidade de armazenamento das suas reservas energéticas, visto que faz uso destas para sustentar possivelmente, eventos de muda e sua própria sobrevivência. M1 parece exercer uma forte dominância hierárquica sobre M2 e isso se reflete no grau de repleção gástrica menor em M2 e negativamente no balanço do anabolismo/catabolismo de suas reservas energéticas. Tal conjunto de respostas pode ser determinante para suprimir a capacidade de M2 chegar a um status reprodutivo naquele ciclo anual. São necessários mais estudos que visem avaliar o efeito de múltiplos estressores ambientais sob a capacidade destes animais se tornarem

reprodutivos, afim de estabelecer melhores planos de manejo e controle para a espécie, em ambientes onde é considerada invasora.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho, ao CNPq pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa para Guendalina T. Oliveira (nº 307303/2012-8) e Paula B. Araujo (305900/2014-5). Ao Dr. Sérgio Bueno da Universidade de São Paulo pelo auxílio em campo, a MSc. Tainã Loureiro da UFRGS pelo auxílio e treinamento para o manejo e identificação dos animais, nos preparativos para o trabalho de campo, obtenção de licenças e contato com os responsáveis pelo parque Alfredo Volpi, aos biólogos Luíza Petroli e Rodrigo Nizolli pelo auxílio em laboratório.

Referências

- Antunes, G.F., Nunes do Amaral, A.P., Ribarcki, F.P., Wiilland, E.F., Zancan, D.M., Vinagre, A.S., 2010. Seasonal variations in the biochemical composition and reproductive cycle of the ghost crab *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) in Southern Brazil. *Journal of Experimental Zoology: Ecological Genetics and Physiology*. 313(a), 280-291.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 373-99
- Beaulieu, M., Costantini, D., 2014. Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology*. 2, 1-16.
- Beaulieu, M., Thierry, A. M., González-Acuña, D., Polito, M. J., 2013. Integrating oxidative ecology into conservation physiology. *Conservation physiology*. 1(1), 4.
- Bissattini, A.M., Traversetti, L., Bellavia, G., Scalici, M., 2015. Tolerance of increasing water salinity in the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852). *Journal of Crustacean Biology*. 35(5), 682-685.

- Blier, P.U., Dufresne, F., Burton, R.S., 2001. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: Evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genetics*. 17(7), 400-6.
- Boveris, A., Cadenas, E., 1982. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. Superoxide dismutase. In: Oberley, L.W., (ed.) 2(2), 15.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*. 134, 707-716.
- Brodie, R. J., Roberts, B., Espinosa, J. I., Heilman, K., Borgianini, S. A., Welch, J. M., and Reinsel, K. A., 2017. Seasonal and latitudinal variations in the energy reserves of the mud fiddler crab *Uca pugnax*: implications for the response to climate change. *Aquatic Biology*. 26, 113-123.
- Buckup, L., Dutra, B.K., Ribarcki, F.P., Fernandes, F.A., Noro, C.K., Oliveira, G.T., Vinagre, A.S., 2008. Seasonal variations in the biochemical composition of the crayfish *Parastacus defossus* (Crustacea, Decapoda) in its natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 149(1), 59-67.
- Bush, N., Bush, E., Green, C., Anderson, J., Blanchard, P., Bush, N., Conover, J., 2016. Mitigation of hypoxic ecosystems using hemolymph analysis of *Callinectes sapidus* and *Procambarus clarkii* in relation to *Spartina grasses*. *Open Journal of Ecology*. 6(08), 484.
- Chang, E.S., O'Connor, J.D., 1983. Metabolism and transport of carbohydrates and lipids. in Mantel, L.H. editor. *The biology of Crustacea*. Academic Press, New York. 263-289.

- Copp, N.H., 1986. Dominance hierarchies in the crayfish *Procambarus clarkii* (Girard, 1852) and the question of learned individual recognition (Decapoda, Astacidea). *Crustaceana*. 51(1), 9-24.
- Costantini D (2014) Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology. Berlin and Heidelberg, Springer, 1-38.
- Cruz, M.J., Segurado, P., Sousa, M., Rebelo, R., 2008. Collapse of the amphibian community of the Paul do Boquilobo Natural Reserve (central Portugal) after the arrival of the exotic American crayfish *Procambarus clarkii*. *The Herpetological Journal*. 18(4), 197-204.
- Dantzer, B., Fletcher, Q., Boonstra, R., Sheriff, M., 2014. Measures of physiological stress: a transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? *Conservation Physiology*. 2, 1-18
- Davis, D.A., and Robinson, E. H., 1986. Estimation of the dietary lipid requirement level of the white crayfish *Procambarus acutus acutus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 17(1-4), 37-43.
- Daws, A. G., Grills, J., Konzen, K., and Moore, P. A., 2002. Previous experiences alter the outcome of aggressive interactions between males in the crayfish, *Procambarus clarkii*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 35(3), 139-148.
- De Freitas, D.R., Vaz Junior, I.D.S., Masuda A., 2008. Expression and enzymatic activity of glutathione s-transferase in tissues of *Boophilus microplus* females. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17(2), 99-104.
- Dutra, B. K., Silva, K. M. D., Zank, C., Conter, M. R., and Oliveira, G. T., 2008. Seasonal variation of the effect of high-carbohydrate and high-protein diets on the intermediate metabolism of *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda,

- Parastacidae) maintained in the laboratory. *Iheringia. Série Zoologia*. 98(4), 433-440.
- Dzal, Y., Jenkin, S.E.M., Lague, S.L., Reichert, M.N., York, J.M., Pamerter, M.E., 2015. Oxygen in demand: How oxygen has shaped vertebrate physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 186, 4-26
- Fanjul-Moles, M.L., Gonsebatt, M.E., 2011. Oxidative stress and antioxidant systems in crustacean life cycles. *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. 208-223.
- Figler, M. H., Twum, M., Finkelstein, J. E., and Peeke, H. V., 1995. Maternal aggression in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*, Girard): the relation between reproductive status and outcome of aggressive encounters with male and female conspecifics. *Behaviour*. 132(1), 107-125.
- Figler, M. H., Blank, G. S., Peeke, H. V., 2005. Shelter competition between resident male red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) and conspecific intruders varying by sex and reproductive status. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 38(4), 237-248.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497-509.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry*. 18(6), 499-502.
- Frings, C.S., Dunn, R.T., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *American Journal of*

- Clinical Pathology. 1, 89-9.
- Gil-del Valle, L., Martínez-Sánchez, G., González-Blanco, I., Pérez-Avila, L.J., 1999. Estrés oxidativo: mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana. *Bioquímica*. 24, 85-93.
- Goretti, E., Pallottini, M., Ricciarini, M.I., Selvaggi, R., Cappelletti, D., 2016. Heavy metals bioaccumulation in selected tissues of red swamp crayfish: An easy tool for monitoring environmental contamination levels. *Science of the Total Environment*. 559, 339-346.
- Grant, A., and Tyler, P. A., 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 6(5-6), 259-269.
- Gu, X., Fu, H., Sun, S., Qiao, H., Zhang, W., Jiang, S., Wu, Y., 2017. Effects of cholesterol on growth, feed utilization, body composition and immune parameters in juvenile oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture Research*. 48(8), 4262-4271.
- Gutiérrez-Yurrita, P. J., Sancho, G., Bravo, M. A., Baltanas, A., and Montes, C., 1998. Diet of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* in natural ecosystems of the Donana National Park temporary fresh-water marsh (Spain). *Journal of Crustacean Biology*. 18(1), 120-127.
- Habig, W.H., Jakoby, W.B., 1981. Glutathione S-Transferase (rat and human). *Methods in Enzymology*. 77(27), 218-239.
- Han, T., Wang, J.T., Li, X.Y., Yang, Y.X., Yang, M., Tian, H.L., Wang, C.L. 2017. Effects of dietary phospholipid and cholesterol levels on growth and fatty acid composition of juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*.

- Aquaculture Nutrition. 24, 164-172.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University 3rd edn. Oxford, United Kingdom. 936 .
- Harayashiki, C.A.Y., Reichelt-Brushett, A.J., Liu, L., Butcher, P., 2016. Behavioural and biochemical alterations in *Penaeus monodon* post-larvae diet-exposed to inorganic mercury. Chemosphere. 164, 241-247.
- Horner, A. J., Schmidt, M., Edwards, D. H., and Derby, C. D., 2008. Role of the olfactory pathway in agonistic behavior of crayfish, *Procambarus clarkii*. Invertebrate Neuroscience. 8(1), 11-18.
- Issa, F.A., Adamson, D.J., and Edwards, D.H., 1999. Dominance hierarchy formation in juvenile crayfish *Procambarus clarkii*. Journal of Experimental Biology. 202(24), 3497-3506.
- Jimenez, A.G., Kinsey, S.T., 2015. Energetics and metabolic regulation. The Natural History of the Crustacea. 4, 391-419.
- Kumar, V., Sinha, A. K., Romano, N., Allen, K. M., Bowman, B. A., Thompson, K. R., and Tidwell, J. H. (2018). Metabolism and Nutritive Role of Cholesterol in the Growth, Gonadal Development, and Reproduction of Crustaceans. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture. 1-20.
- Lafont, R., and Mathieu, M. (2007). Steroids in aquatic invertebrates. Ecotoxicology. 16(1), 109-130.
- Laufer, H., Demir, N., Pan, X., Stuart, J. D., Ahl, J. S., 2005. Methyl farnesoate controls adult male morphogenesis in the crayfish, *Procambarus clarkii*. Journal of Insect Physiology. 51(4), 379-384.
- Lesser, M.P., 2006. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. Annual Review of Physiology. 68(3), 253-278

- Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 37, 293-303.
- Loureiro TG, Anastácio PMSG, Araujo PB, Souty-Grosset C, Almerão MP (2015)a Red swamp crayfish: biology, ecology and invasion -an overview. *Nauplius*. 23(1), 1-19.
- Loureiro TG, Anastácio PM, Bueno SL, Araujo PB, Souty-Grosset C, Almerão MP (2015)b Distribution, introduction pathway, and invasion risk analysis of the North American crayfish *Procambarus clarkii* (Decapoda: Cambaridae) in Southeast Brazil. *Journal of Crustacean Biology*. 35(1), 88-96.
- Madliger, C. L., Cooke, S. J., Crespi, E. J., Funk, J. L., Hultine, K. R., Hunt, K. E., and Love, O. P., 2016. Success stories and emerging themes in conservation physiology. *Conservation physiology*. 4(1).
- Martínez-Cayuela, M., 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica*. 39, 5-18.
- Momot, W.T., 1995. Redefining the role of crayfish in aquatic ecosystems. *Reviews in Fisheries Science*. 3, 33-63
- Musin, G.E., Rossi, A., Diawol, V.P., Collins, P.A., Williner, V., 2017. Dynamic metabolic pattern of *Aegla uruguayana* (Schmitt, 1942) (Decapoda: Anomura: Aeglidae): responses to seasonality and ontogeny in a temperate freshwater environment. *The Journal of Crustacean Biology*. 37(4), 436-444.
- Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM (2014) *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan 6,1-1299.
- Nappi, A.J., Ottaviani, E., 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays*. 22, 469-80.

- Oliveira, G.T., Da Silva, R.S., 1997. Gluconeogenesis in hepatopancreas of *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 118(4), 1429-1435.
- Oliveira, G.T., Fernandes, F.A., Bueno, A.A.P., Bond-Buckup, G., 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 147, 600-606.
- Oliveira, J., Fabião, A., 1998. Growth responses of juvenile red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* Girard, to several diets under controlled conditions. *Aquaculture Research*. 29(2), 123-129.
- Peng, S., Yin, F., Sun, P., Shi, Z., and Wang, J., 2010. Effects of different diets on weight gain, hepatic lipase and antioxidant enzyme of juvenile silver pomfret (*Pampus argenteus*). *Journal of Fisheries of China*. 34(6), 769-774.
- Peruzza, L., Piazza, F., Manfrin, C., Bonzi, L.C., Battistella, S., Giulianini, P.G., 2015. Reproductive plasticity of a *Procambarus clarkii* population living 10° C below its thermal optimum. *Aquatic Invasions*. 10(2).
- Pinheiro LC (2014) Variações sazonais do metabolismo energético e do balanço oxidativo em *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) (Master's thesis, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul).
- Pinheiro, L.C., Oliveira, G.T., 2016. Oxidative status profile in different tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a seasonal cycle. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 325(5), 318-328.
- Powell, M.L., Watts, S.A., 2010. Response to Long-term Nutrient Deprivation and Recovery in the Crayfishes *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus*

- (Crustacea, Decapoda): Component and proximate analyses. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41(1), 71-80.
- Richardson, K.L., Lopez, C.M., Gardner, S.C., Schlenk, D., 2010. Polychlorinated biphenyls and biotransformation enzymes in three species of sea turtles from the baja California peninsula of Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58(1), 183-193.
- Salaenoi, J., Srimeetian, P., and Mingmuang, M., 2014. Variations of Catalase and Glutathione Activities in Molting Cycle of Mud Crab (*Scylla serrata*). *Kasetsart Journal-Natural Sciences*. 48(1), 64-71.
- Schlenk, D., Di Giulio, R.T., 2002. Biochemical responses as indicators of aquatic ecosystem health. In: *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. American Fisheries Society: Maryland.: Adams, S.M. 13-42.
- Sies, H., 1991. *Stress II Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, London (London, UK).
- Silva-Castiglioni, D., Dutra, B.K., Oliveira, G.T., Bond-Buckup, G., 2007. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Parastacus varicosus* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 148, 204-213.
- Silva-Castiglioni, D., Dutra, B.K., Oliveira, G.T., Buckup, L., 2012. Comparison of the seasonal variation of the biochemical composition in two species of freshwater crayfish from southern Brazil. *Animal Biology*. 62(1).
- Silva-Castiglioni, D., Valgas, A.A.N., Machado, I.D., Freitas, B.S., Oliveira, G.T., 2016. Effect of different starvation and refeeding periods on macromolecules in the haemolymph, digestive parameters, and reproductive state in *Aegla platensis* (Crustacea, Decapoda, Aeglidae). *Marine and Freshwater Behaviour*

- and Physiology. 49(1), 27-45.
- Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle Jr., P.M., Bergman, H.L. Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis Publishers, Chelsea. 235-335.
- Suko, T., 1956. Studies on the development of crayfish IV. Development of winter eggs. Science Reports of Saitama University. 2B, 213-219.
- Taketomi, Y., Murata, M., and Miyawaki, M., 1990. Androgenic gland and secondary sexual characters in the crayfish *Procambarus clarkii*. Journal of Crustacean Biology. 10(3), 492-497.
- Taketomi, Y., Nishikawa, S., and Koga, S., 1996. Testis and androgenic gland during development of external sexual characteristics of the crayfish *Procambarus clarkii*. Journal of Crustacean Biology. 16(1), 24-34.
- Van Handel, E., 1965. Estimation of Glycogen in Small Amounts of Tissue. Anal Biochemical. 11(2), 256-65.
- Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Vilella, S., Ahearn, G.A., Storelli, C., 2001. d-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. Comparative Biochemistry and Physiology—Part A: Molecular and Integrative Physiology. 130, 585-606.
- Vinagre AS, Da Silva RS (1992) Effects of starvation on the carbohydrate and lipid metabolism in crabs previously maintained on a high protein or carbohydrate-rich diet. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 102(3), 579-583.

- Vinagre, A.S., do Amaral, A.P.N., Ribarcki, F.P., da Silveira, E.F., Périco, E., 2007. Seasonal variation of energy metabolism in ghost crab *Ocypode quadrata* at Siriú Beach (Brazil). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 146(4), 514-519.
- Weihrauch, D., Fehsenfeld, S., Quijada-Rodriguez, A., 2017. Nitrogen excretion in aquatic crustaceans. In *Acid-Base Balance and Nitrogen Excretion in Invertebrates*. Springer, Cham. 1-24.
- Wilke, A.B.B., Medeiros-Sousa, A.R., Multini, L.C., Ceretti-Junior, W., Marrelli, M.T., 2017. Mosquito population diversity and abundance patterns in two parks in São Paulo, Brazil. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 33(1), 67-70.
- Willians, M.J., 1981. Methods for analysis of natural diet in portunid crabs (Crustacea: Decapoda: Portunidae). *Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology*. 52, 103-113.
- Yazicioglu, B., Reynolds, J., and Kozák, P., 2016. Different aspects of reproduction strategies in crayfish: a review. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*. 417, 33.
- Yepiz-Plascencia, G., Jimenez-Veja, F., Romo-Figueroa, M.G., Sotelo-Mundo, R.R., Vargas-Albores, F. 2002. Molecular characterization of the bifunctional VHDL-CP from the hemolymph of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 132(B),585-592.
- Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. 2000. Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. *Aquaculture*. 191,177-189.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. Prentice Hall International, INC, Upper Saddle River, New Jersey.

Zizzari, Z.V, Jessen, A., and Koene, J. M., 2016. Male reproductive suppression: not a social affair. *Current Zoology*. 63, 573-579.

Tabelas e Figuras



Figura 1. Grau de repleção gástrica e índice hepatossomático de machos reprodutivos (M1) e não reprodutivos (M2). Barras azuis representam dados referentes à M1, barras verdes representam dados referentes à M2: A- grau de repleção gástrica de M1: B - grau de repleção gástrica de M2: C- índice hepatossomático de M1: D- índice hepatossomático de M2: Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste de Kruskal-Wallis, complementar de Dunn) e * indica diferença entre as curvas de M1 e M2 ao longo do ano (teste de Friedman).

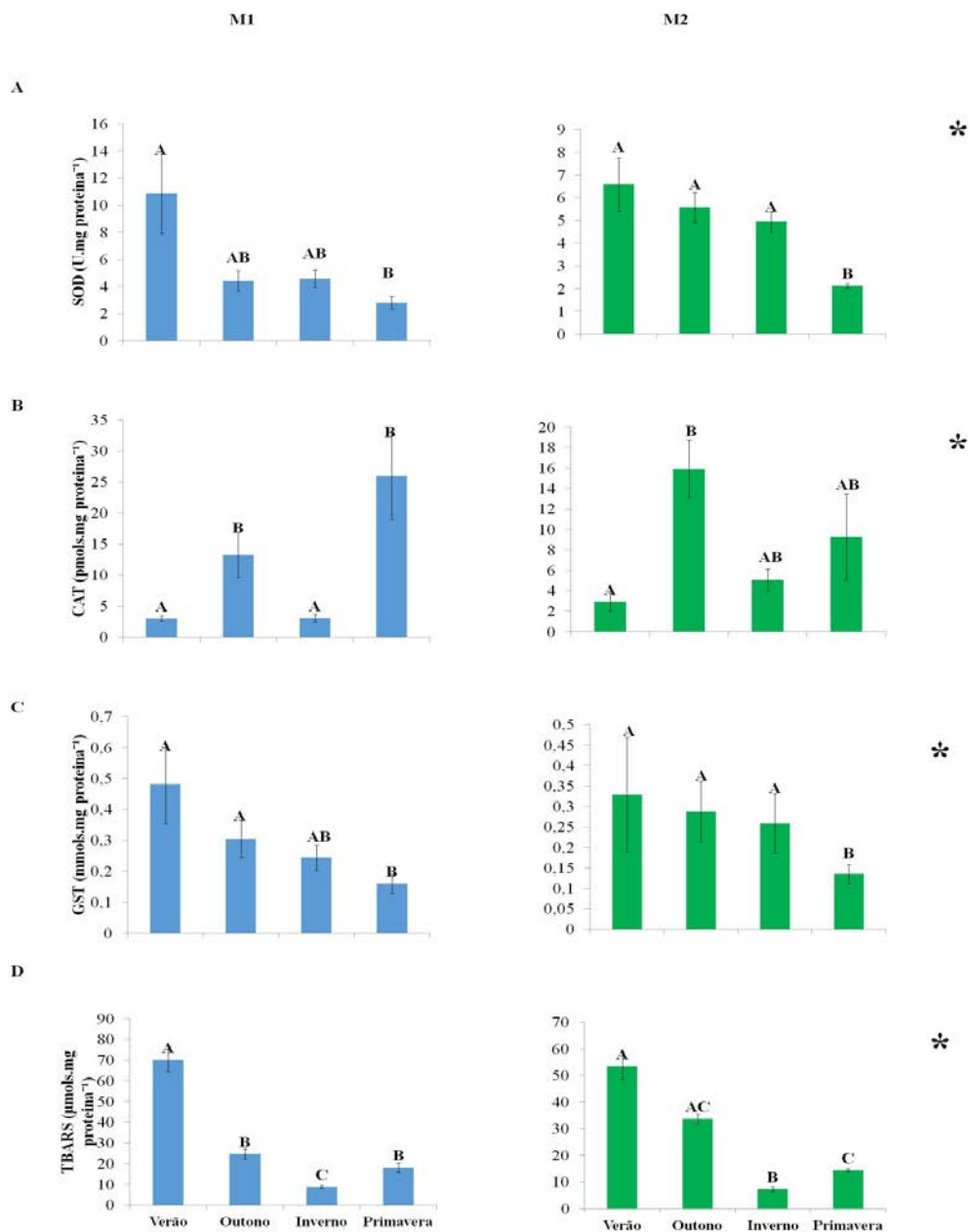


Figura 2. Atividade Enzimática e nível de lipoperoxidação no Músculo Abdominal de machos reprodutivos (M1) e não reprodutivos (M2) de *Procambarus clarkii*. Barras azuis representam dados referentes à M1, barras verdes dados referentes à M2. A - atividade de SOD: B - atividade de CAT: C - atividade de GST: D - níveis de LPO. Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste de Kruskal-Wallis, complementar de Dunn) e * indica diferença entre as curvas de M1 e M2 ao longo do ano (teste de Friedman).

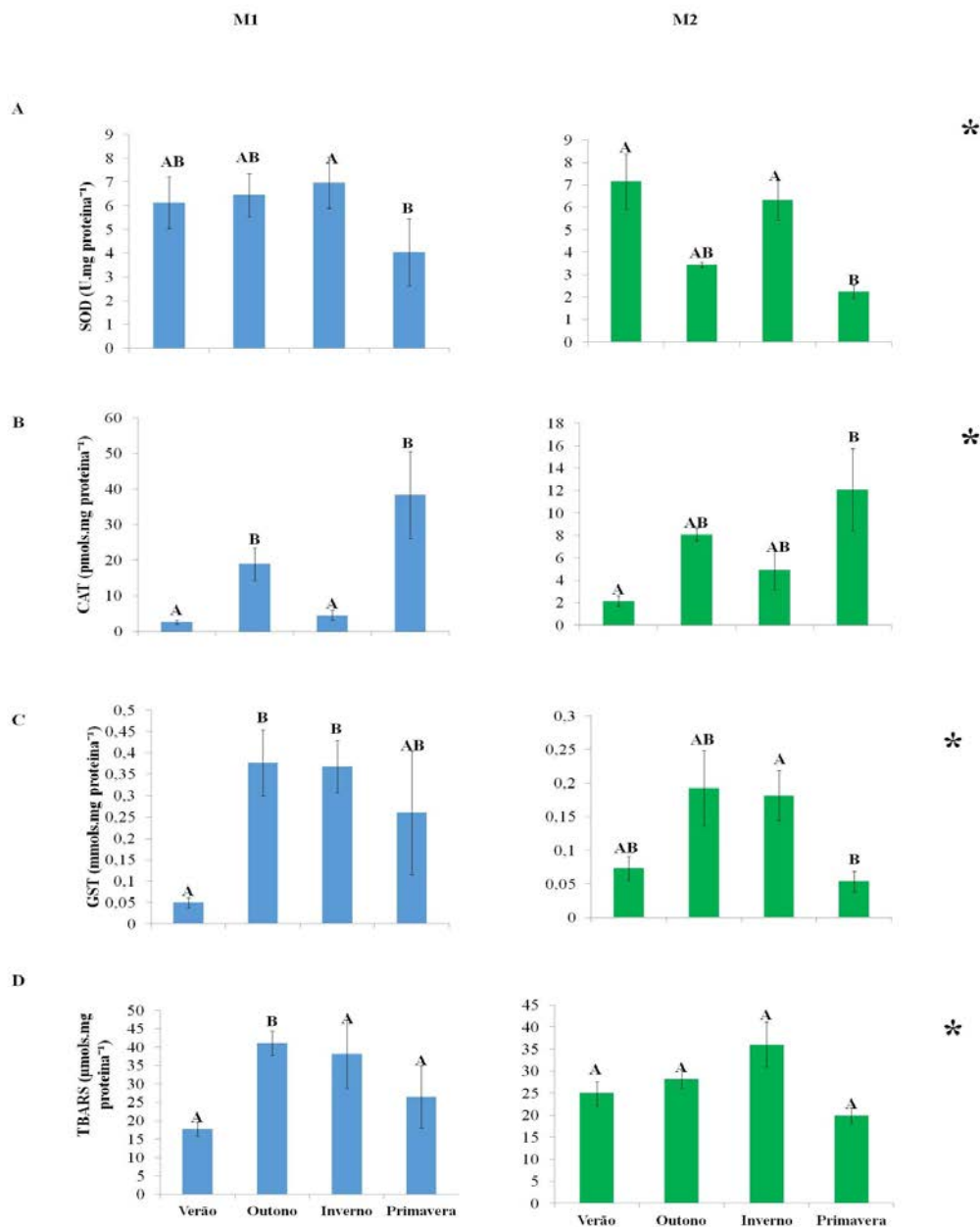


Figura 3. Atividade Enzimática e nível de lipoperoxidação no Hepatopâncreas de machos reprodutivos (M1) e machos não reprodutivos (M2) de *Procambarus clarkii*. Barras azuis representam dados referentes à M1, barras verdes representam dados referentes à M2. A - atividade de SOD: B - atividade de CAT: C - atividade de GST: D - níveis de LPO. Letras diferentes indicam diferenças significativas (teste de Kruskal-Wallis, complementar de Dunn) e * indica diferença entre as curvas de M1 e M2 ao longo do ano (teste de Friedeman).

Tabela 1. Medidas morfológicas. Comprimento e massa dos animais: Letras diferentes representam diferenças significativas (Test t).

	Comprimento (mm)	Massa (g)
M1	85.42±0.69 a	22.83 a
M2	76.91± 1.004 a	13.70 b

Tabela2. Metabolismo intermediário. Metabólitos hemolinfáticos (Glicose, Proteínas, Ácido Úrico, Lipídeos totais, Triglicerídeos, Colesterol total, Colesterol VLDL), metabólitos dos tecidos musculares e hepatopancreáticos (Glicogênio, Proteínas totais, Lipídeos Totais, Triglicerídeos e Colesterol total) de machos reprodutivos (M1) e não reprodutivos (M2) de *Procambarus clarkii* ao longo do ciclo sazonal. Letras diferentes significam diferenças estatísticas (teste de Kruskal-Wallis, complementar de Dunn), * representa diferença entre as curvas dos metabólitos de M1 e M2 ao longo do ano (teste de Friedman).

	M1				M2			
	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Hemolinfa								
Glicose (mg.mL ⁻¹)*	23.90±3.28 a	21.27±2.70 a	25.07±4.98 a	26.07±7.24 a	21.12±2.18 a	22.43±3.37 a	12.98±2.14 b	39.74±9.78 a
Proteína (mg.mL ⁻¹)*	58.49±3.03 a	48.88±6.59 b	31.13±2.16 c	28.82±3.25 c	43.56±3.65 a	76.41±5.83 b	31.01±1.84 c	24.67±1.83 c
Ácido Úrico (mg.mL ⁻¹)*	0.688±0.074 a	1.13±0.21 ab	1.07±0.18 ab	1.27±0.10 b	1.06±0.08 ac	0.66±0.11 b	1.03±0.06 a	1.51±0.14 c
Lípido (mg.mL ⁻¹)*	113.69±11.07 a	114.02±18.56 a	64.05±3.54 b	162.91±11.31 c	121.88±12.15 a	88.44±4.98 b	96.10±8.25 b	118.48±7.59 a
Triglicerídeos (mg.mL ⁻¹)*	24.38±3.26 a	26.32±5.47 a	20.28±1.84 a	17.70±0.97 a	34.06±5.21 ac	30.27±1.19 a	20.65±2.58 b	23.42±1.94 bc
Colesterol Total (mg.mL ⁻¹)*	20.33±4.33 a	20.32±3.23 a	13.73±1.62 a	6.97±0.74 b	61.16±19.20 a	37.05±11.51 a	41.36±8.78 a	9.03±0.88 b
Colesterol VLDL (mg.mL ⁻¹)*	4.87±0.65 a	5.26±1.09 a	4.05±0.36 a	3.54±0.19 a	6.81±1.04 a	6.05±0.23 a	4.13±0.51 b	4.68±0.38 ab
Músculo								
Glicogênio (mg.g ⁻¹)*	0.16±0.05 a	0.07±0.01 a	0.44±0.08 b	0.71±0.28 c	0.33±0.14 a	0.04±0.01 b	0.33±0.06 ac	0.43±0.05 c
Proteína (mg.g ⁻¹)*	68.18±8.53 a	82.51±12.42 a	29.20±12.42 b	28.02±3.49 b	61.79±10.09 a	12.51±1.10 b	37±40±4.35 a	18.88±3.69 b
Lípido (mg.g ⁻¹)*	1.60±0.23 a	1.72±0.40 a	1.38±0.28 a	2.69±0.21 b	11.06±3.13 a	1.36±0.36 b	2.36±0.32 bc	2.62±0.12 c
Triglicerídeos (mg.g ⁻¹)*	0.54±0.11 a	0.03±0.0052 b	0.11±0.04 b	0.08±0.02 b	0.46±0.15 a	0.01±0.0049 b	0.24±0.05 a	0.05±0.0094 c
Colesterol (mg.g ⁻¹)*	0.34±0.13 a	1.37±0.14 b	3.31±0.64 c	0.44±0.06 a	0.61±0.15 a	2.41±0.47 b	0.21±0.03 a	0.40±0.04 a
Hepatopâncreas								
Glicogênio (mg.g ⁻¹)*	0.47±0.13 a	0.64±0.11 ab	0.80±0.07 b	0.41±0.04 a	0.27±0.05 a	0.75±0.07 b	1.73±0.24 c	0.51±0.04 ab
Proteína (mg.g ⁻¹)*	14.72±5.51 a	27.30±2.60 b	12.53±2.89 a	13.63±3.44 a	4.78±1.63 a	4.82±0.38 a	6.79±1.26 a	7.88±2.73 a
Lípido (mg.g ⁻¹)*	14.22±2.04 a	18.58±3.72 a	4.50±0.79 b	8.11±0.89 b	82.15±9.18 a	1.36±0.36 b	11.42±2.77 b	13.46±1.87 b
Triglicerídeos (mg.g ⁻¹)*	0.46±0.02 a	0.05±0.01 b	0.38±0.06 a	0.21±0.02 c	1.40±0.31 a	0.07±0.01 b	0.34±0.05 ac	0.18±0.01 c
Colesterol (mg.g ⁻¹)*	0.31±0.08 a	0.71±0.13 b	0.63±0.21 b	0.42±0.12 ab	1.19±0.20 a	0.94±0.30 a	0.20±0.02 b	0.94±0.05 a

Material Suplementar

Tabela 1. Variáveis abióticas. Temperatura do ar, temperatura da água, pH da água, oxigênio dissolvido na água e precipitação.

	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Temperatura do Ar (°C)	23,11	19,89	17,85	20,41
Temperatura da Água(°C)	22,75	22,26	16,8	20,8
pH da Água	6,2	6,4	6,2	6,4
Oxigênio Dissolvido na Água (mg.L ⁻¹)	7,56	5,85	7,74	7,6
Preceptação (mm)	0,32	0,15	0,05	0,19

Considerações Finais

Essa dissertação foi o primeiro trabalho a investigar as variações sazonais metabólicas, balanço oxidativo, índices corporais e grau de repleção gástrica, em *Procambarus clarkii* capturados em ambiente natural. Foi possível identificar o período reprodutivo da espécie no Brasil, reconhecer as diferenças, competências e estratégias fisiológicas que esta espécie lança para manter a homeostase e detectar o período de maior suscetibilidade a estressores antropogênicos.

O primeiro capítulo investigou as respostas sazonais e ciclo reprodutivo de fêmeas da espécie e foi possível constatar que as fêmeas apresentam alto grau de investimento na reprodução, estando este evento associado a uma diminuição da atividade alimentar e à mobilização de substratos energéticos (lipídeos, proteínas e carboidratos). Este investimento traz consigo um ônus durante o pico reprodutivo, conduzindo a um incremento do dano oxidativo. No segundo capítulo foram investigamos as variações ciclo-anuais e diferenças bioquímico-funcionais de machos reprodutivos (M1) e não reprodutivos (M2). Ficou clara a distinção do perfil de variação sazonal do metabolismo intermediário e do balanço oxidativo entre os morfotipos M1 e M2, com M1 apresentando maior predominância de estômagos cheios durante todo o ano como também, uma maior alocação de substratos energéticos a fim de manter a reprodução. M2 por sua vez, investe em crescimento e sobrevivência.

Com a realização deste trabalho, mais questionamentos surgiram, como por exemplo: (1) Como a espécie lida com as variações sazonais em seu ambiente de origem? (2) Será que quando exposta a múltiplos estressores é capaz de sobreviver e manter a reprodução? São necessários futuros trabalhos que visem responder estas e outras perguntas, a fim de contribuir para o estabelecimento de planos de manejo que tenham sucesso no controle das populações de *Procambarus clarkii* em ambientes onde foi introduzido.