



Universidade Federal do Rio Grande - FURG  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Dissertação de Mestrado

EFEITO DA HIPOXIA E ALTA TEMPERATURA NA MODULAÇÃO  
DA HEMOCIANINA NO CARANGUEJO *Neohelice granulata*

Bruna Soares Ayres

*Dissertação defendida no âmbito do Programa  
de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Mestre.*

Orientador: Prof. Dr. Fábio Everton Maciel.  
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery

Rio Grande, Julho de 2017.

## Sumário

1. Agradecimentos.....	3
2. Resumo Geral.....	5
3. <i>Abstract</i> .....	7
4. Introdução .....	9
5. Objetivo.....	18
6. Artigo .....	19
6. Discussão Geral.....	47
7. Bibliografia Geral.....	51

## 1. Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela oportunidade de chegar até aqui, por estar sempre comigo e principalmente me dar coragem de passar tantas noites de experimentos na FURG.

Ao meu Pai, que apesar de tantas brigas, me levou inúmeras vezes ao laboratório à noite, aos fins de semana, madrugada, aniversário, dia dos pais.... Obrigada.

A tia Luciane e Tia Marcia, que infelizmente não poderão ver esse final de etapa da minha vida. Obrigada por terem sido mãe, tia e minhas melhores amigas. Obrigada por comemorar as vitórias, pelos puxões de orelha, me apoiarem nas minhas escolhas, por mais loucas que fossem. Obrigada por me ensinarem o essencial dessa vida. Onde quer que vocês estejam, dedico tudo a isso vocês. Amo vocês mais do que tudo. Maluní!

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio, que me ensinou quase tudo que hoje eu sei sobre pesquisa, por sua enorme paciência (quase infinita) que eu fiz questão de testar todo santo dia durante tantos anos de orientação e ao meu coorientador Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery por me ensinar tanto nessa trajetória acadêmica. Obrigada!

Aos meus amigos que orgulhosamente seguimos sonhando juntos nessa vida, em especial aos cariocas mais lindos desse mundo, Mariana, Victor e Priscila, que nossa amizade dure eternamente e não se limite pela distância nunca. A Michele, Alana, Katiuscia, Letícia e Shauanda pelo apoio incondicional durante esses anos. Gratidão eterna gurias!

A minha colega de mestrado e de cagadas no laboratório Lamia, por nunca subestimar nossa burrice. Ao pessoal da salinha dois por esses dois anos de convivência. Ao melhor amigo e estagiário Luiz, pelas noites que dormiu comigo no laboratório e por ser tão dedicado com tudo. Amo você. A melhor estagiária emprestada Tâmela que é tão mais atinada que eu, obrigada!

Aos professores membros da banca por aceitar o convite e pelas colaborações.

A FURG, ICB e PGCF pela oportunidade, aos órgãos financiadores CAPES, CNPq,  
FAPERGS e IFS.

A porteira do prédio ICB II, Inês, pela companhia durante essas longas noites de  
experimento, amizade e comilanças. Muito obrigada Inesita!

## 2. Resumo Geral

O caranguejo *Neohelice granulata* encontra-se naturalmente exposto em seu habitat a condições variadas de temperatura e concentração de oxigênio dissolvido na água. Fatores abióticos são conhecidos por afetar a afinidade dos pigmentos respiratórios pelo oxigênio nos animais, incluindo crustáceos. Portanto, o objetivo desta dissertação foi verificar quais as possíveis respostas fisiológicas de *N. granulata* na modulação da hemocianina em exposição a hipóxia e alta temperatura. Para isso os animais foram submetidos a altas temperaturas e foi avaliado a mortalidade em 96h. Além disso, os animais foram expostos a diferentes temperaturas (20°C e 30°C) simultaneamente a diferentes concentrações de oxigênio (6mgO<sub>2</sub>L e 3mgO<sub>2</sub>L) por 24 e 96h e posteriormente expostos a 4h hipóxia severa (1mgO<sub>2</sub>L), sendo analisados a concentração de oxihemocianina, íons e lactato hemolinfático. Em relação a mortalidade, os animais expostos a 36°C e 35°C atingiram 100% de mortalidade, enquanto a 34°C a mortalidade máxima foi de 23,3% em 96 horas; a 33°C não foi observada mortalidade. Em relação a exposição temporal, apesar de haver alterações iônicas não ocorreu variação na oxihemocianina em ambas condições. Animais aclimatados a 30°C e 6mgO<sub>2</sub>L e posteriormente expostos a 1mgO<sub>2</sub>L houve uma queda nas concentrações de oxihemocianina, magnésio e lactato enquanto em animais aclimatados a 30°C e 3mgO<sub>2</sub>L e posteriormente expostos a 1mgO<sub>2</sub>L ocorreu um aumento no lactato e na oxihemocianina. Os íons de cálcio, cloreto e magnésio não parecem estar relacionados como moduladores nestas condições enquanto que o aumento do lactato demonstrou uma relação com o aumento da oxihemocianina. Embora esses íons sejam moduladores em outras espécies de crustáceos, nas condições

experimentais aplicadas não alterou os níveis de oxihemocianina, enquanto o lactato demonstrou ser um possível modulador para esta espécie quando os animais previamente aclimatados a alta temperatura e em hipóxia moderada e posteriormente expostos a uma hipóxia severa.

**Palavras chave:** hipóxia, lactato, moduladores, oxihemocianina e temperatura.

### 3. Abstract

The crab *Neohelice granulata* is naturally exposed in habitat under varying conditions of temperature and concentration of dissolved oxygen in the water. Abiotic factors are known to affect the affinity of respiratory pigments for oxygen in animals, including crustaceans. Thus, the aim of this work was to verify the effects of high temperature and exposure to hypoxia in the modulation of hemocyanin in the crab *Neohelice granulata*. The animals were submitted to high temperatures for 96h and the mortality was evaluated. In addition, animals were exposed to different temperatures (20°C e 30°C) simultaneously at different oxygen concentrations (6mgO<sub>2</sub>L e 3mgO<sub>2</sub>L) for 24 and 96h and then at 4h in severe hypoxia (1mgO<sub>2</sub>L), and analyzed concentrations of oxyhemocyanine, ions and hemolymphatic lactate. The animals exposed at 36°C and 35°C showed 100% of mortality, while at 34°C the maximum mortality of 23.3% in 96 hours; at 33°C no mortality was observed. In the temporal exposure, although there were alterations in the ionics, here was no variation in oxyhemocyanin in both conditions. Animals acclimatized at 30°C and 6mgO<sub>2</sub>L and posteriorly exposed to 1mgO<sub>2</sub>L showed a decrease in the concentrations of oxyhemocyanin, magnesium and lactate while in animals acclimated at 30°C and 3mgO<sub>2</sub>L and posteriorly exposed to 1mgO<sub>2</sub>L an increase in lactate and oxyhemocyanin occurs. Calcium, chloride and magnesium ions do not appear to be related as modulators under these conditions and while the increase in lactate has been shown to correlate with the increase of oxyhemocyanin. Although these ions are modulators in other species of crustaceans, in the experimental conditions applied did not alter the levels of oxyhemocyanin, while lactate proved to be a possible modulator for this species when the animals previously

acclimatized at high temperature and in moderate hypoxia and subsequently exposed to severe hypoxia.

**Key words:** hypoxia, lactate, modulators, oxyhemocyanin and temperature.



#### 4. Introdução

Os estuários são ecossistemas caracterizados por corpos de água costeiros semi-fechados, com a comunicação para o oceano (Cameron & Pritchard, 1963). Estes estão sob influência frequente de fatores oceanográficos e meteorológicos, expondo os organismos a um estresse ambiental, devido a variações de salinidade, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido na água (Cooper, 1974).

Há alguns anos tem sido verificada uma significativa variação do clima em escala global e em climas regionais, sendo o aumento da temperatura um dos fatores mais modificados. Estima-se que durante o século XX a temperatura aumentou em média 0,6°C (Houghton et al., 1995) e este aquecimento está alterando o clima e afetando ecossistemas aquáticos, incluindo os estuários (Roessig et al., 2004). O desenvolvimento da tolerância térmica em animais é limitado pela capacidade de transporte de oxigênio, sendo uma condição para manter o fornecimento de oxigênio e definir o limite de temperatura superior dos animais aquáticos (Pörtner, 2010). O limite de temperatura superior (altas temperaturas) é definido quando a exposição ao estresse térmico causa perda de função motora, comprometendo a função ecológica do animal (Sunday et al. 2010). Espécies subtropicais têm uma menor tolerância ao aumento de temperatura (Deutsch et al., 2008; Huey et al. 2009; Duarte et al., 2012). Animais expostos a temperatura ótima (entre  $T_{pI}$  e  $T_{pII}$ ) apresentam metabolismo aeróbico com a hemolinfa completamente oxigenada (Fig. 1). O aumento da temperatura promove alterações no metabolismo e desencadeia uma hipóxia sistêmica, em que há uma incapacidade cardiorrespiratória de manter o metabolismo aeróbico, iniciando a anaerobiose (Pörtner 2002; Pörtner et al. 2005). Adicionalmente, quando animais são expostos a temperatura crítica ( $T_{cII}$ ) ajustes nos mecanismos de proteção molecular, como proteínas de choque-térmico e

enzimas antioxidantes, a fim de evitar uma desnaturação protéica e danos oxidativos, podem ocorrer em função do aumento de temperatura (Pörtner 2002; Pörtner et al., 2005).

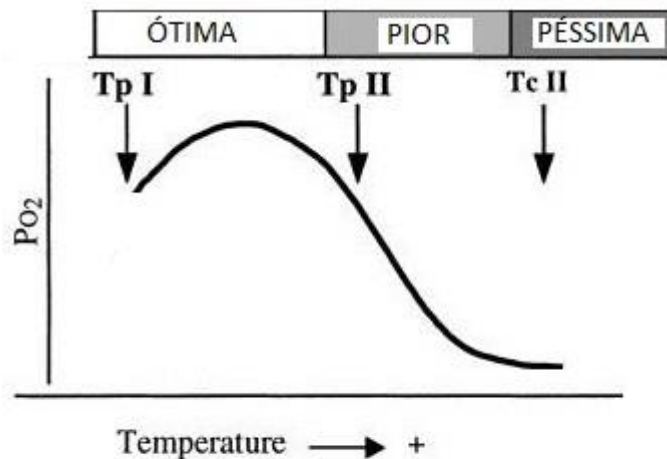


Figura 1: Modelo da tolerância térmica para animais ectotérmicos. Figura adaptada. (Frederich & Pörtner, 2000).

Em ambientes costeiros, além da influência dos fatores abióticos como a temperatura, ações antrópicas podem acarretar um excesso de nutrientes e por consequência a eutrofização da água (Rabalais et al., 2010; Verity et al., 2006) levando à diminuição do oxigênio dissolvido (Almeida et al. 1993; Baumgarten et al. 2010). Diaz (2010) definiu como hipóxia concentrações de oxigênio dissolvido abaixo de  $2\text{mgO}_2/\text{L}$  dissolvido na água e foi verificado que regiões hipóxicas em estuários estão aumentando em incidência no mundo (Diaz e Rosenberg, 2008). Alguns animais são mais tolerantes a diminuição de oxigênio, porém dependendo do grau de hipóxia e o tempo em que animais de exposição a este ambiente estressor pode ser letal para muitas espécies (Vaquer-Sunyer et al., 2008), acarretando na

diminuição da diversidade de espécies e prejudicando o ecossistema (Baird et al., 2004; Bishop et al., 2006).

A tolerância a hipóxia é muito variável. Em comparação aos grupos de animais resistentes a diminuição do oxigênio, os Priapulidas são os animais mais tolerantes, seguido por moluscos, anelídeos, peixes e crustáceos; que são os animais mais sensíveis a hipóxia quando comparados a outros grupos (Vaquer-Sunyer et. al., 2008). Porém, muitos crustáceos estão adaptados a diversos ambientes (Hartnoll, 1998), onde tiveram sucesso adaptativo em colonizar ambientes marinhos (Melo, 1996), ambientes de água doce e ambientes terrestres (Hartnoll, 1964). Para os crustáceos sobreviverem em ambientes sujeitos a variações de concentração de oxigênio e temperatura, são necessárias estratégias bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. Estes mecanismos incluem respostas conhecidas como manutenção de altos níveis de combustíveis energéticos como glicogênio (Maciel et al. 2008), depressão metabólica (Childress and Seibel, 1998), ativação do metabolismo anaeróbico (Geihs et al., 2013), recirculação da água (Santos et al., 1987), exposição ao ambiente aéreo (Lima et.al, 2015) e aumento da quantidade e afinidade do pigmento respiratório pelo oxigênio (Head, 2010).

O pigmento respiratório de crustáceos é a hemocianina, a qual se encontra dissolvida na hemolinfa. A hemocianina tem como função o transporte de oxigênio, para que o mesmo seja fornecido para os tecidos e órgãos do organismo (Engel, 1993). Este pigmento respiratório é constituído de seis subunidades protéicas (hexâmeros), sendo que a hemocianina circulante pode ser composta por uma, duas, quatro ou oito destes hexâmeros (Brouwer, 1992; Ellerton et al. 1983; Magnus et al. 1994, Hazes et al. 1993; van Holde & Miller, 1982; Volbeda & Hol 1989). Cada subunidade da hemocianina contém três sítios de domínios protéicos diferentes (I, II

e III), sendo o domínio II com quatro  $\alpha$ -hélices e com um sítio ativo contendo dois íons de cobre, onde ocorre a ligação do oxigênio (Fig. 2) (Cuff et al., 1998).

Alguns fatores abióticos podem induzir mudanças na afinidade da hemocianina pelo oxigênio e modificar o seu transporte. Quando os animais são expostos, por

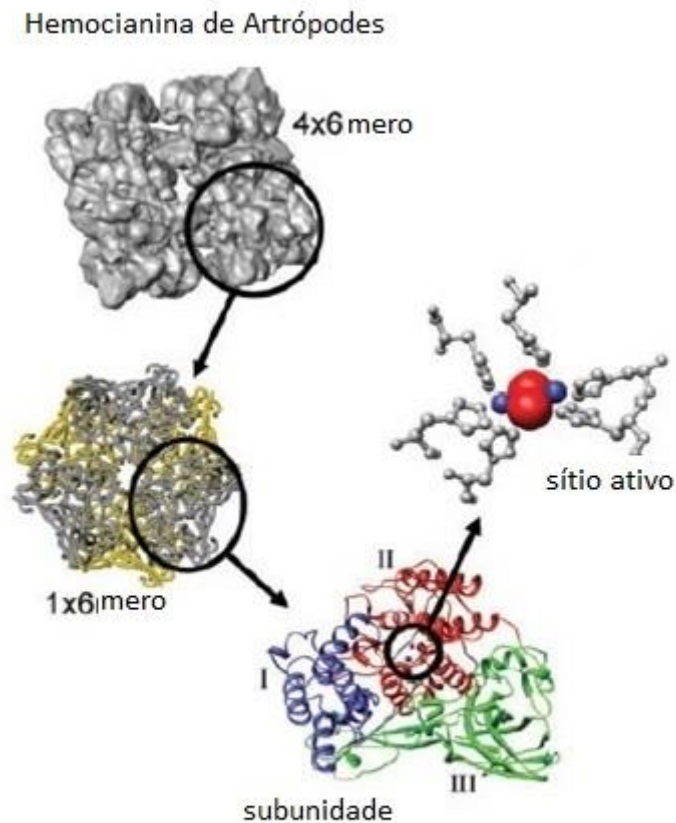


Figura 2: Esquema ilustrativo das subunidades da hemocianina com seus sítios ativos (Adaptado de Decker et al., 2007).

exemplo, a hipóxia ou alterações de temperatura, ocorre uma maior afinidade pelo oxigênio, o que acarretará na maior ligação do oxigênio na hemocianina (também chamada de oxihemocianina), quando a hemolinfa passar nas brânquias, aumentando desta forma a captação de oxigênio neste órgão. Porém, há uma limitação dessas alterações dependente da eficiência da ventilação e pressão hemolinfática (Bridges, 2001).

O aumento na concentração do pigmento respiratório é uma das estratégias utilizadas quando os crustáceos são expostos a uma hipóxia crônica (Baden et al., 2003; Giomi & Beltramini, 2007; Rathburn et al. 2013). Também foi verificado que concentrações de hemocianina de animais que habitam ambientes degradados por atividades antrópicas são reduzidas em relação às concentrações de hemocianina de crustáceos que habitam áreas mais conservadas (Engel, 1993). Locais onde ocorre despejo de efluente doméstico, industrial e/ou da atividade de agricultura, acarretam na geração de excesso de nutrientes e promove a eutrofização da água (Almeida et al. 1993; Baumgarten et al. 2001), que desencadeia a morte de muitos produtores primários dando origem a áreas com baixos teores de oxigênio que, por consequência, inibe o crescimento de organismos aeróbicos (Abreu et al. 2010). Além da maior síntese deste pigmento, outra estratégia utilizada é a alteração na composição de subunidades da hemocianina (deFur et al. 1990; Head, 2010).

As alterações na temperatura levam a modificações na temperatura corporal de animais ectotérmicos que pode gerar impacto sobre mecanismos fisiológicos (Santos & Moreira, 1991). A temperatura também é um dos fatores ambientais que afeta a hemocianina, modificando a conformação intrínseca das subunidades, uma vez que a temperatura influencia na alteração do pH. Quando organismos são expostos a alta temperatura em comparação a organismos mantidos em temperatura ambiente, ocorre um aumento na taxa metabólica (Vernberg, 1959). Assim, gerando um estado de hipóxia sistêmica pela incapacidade em sustentar a demanda tecidual por oxigênio (Pörtner 2001). Isto induz à respiração anaeróbica, gerando aumento nos níveis de  $H^+$ , podendo acidificar o pH hemolinfático (Mangum, 1983; Truchot, 1992). Rutledge (1981) verificou em *Pacifastacus leniusculus* uma maior afinidade da hemocianina pelo oxigênio quando exposto a 25°C em comparação ao controle

(20°C). Em *Procambarus clarkii* e *P. zonangulus* foi observado o aumento da afinidade quando estes crustáceos foram expostos e aclimatados a 30°C (Powell et al., 2006). Em *Limulus polyphemus* sob o aumento gradual nas temperaturas de 15°C até 18 °C e 23°C por 53 dias houve uma diminuição na concentração de hemocianina, porém não foi observado diminuição na afinidade da hemocianina pelo oxigênio (Coastes, 2012). Essas mudanças na afinidade da hemocianina pelo oxigênio em situações de mudanças ambientais são devidas a alterações em substâncias moduladoras (Truchot, 1992), que podem agir de forma positiva, aumentando a afinidade ou de forma negativa, diminuindo a afinidade (McMahon, 1985) (Fig. 3). Morris (1990) definiu que moduladores são substâncias que respondem a condições ambientais ou estresse por uma mudança na concentração, assim influenciando a afinidade da hemocianina pelo oxigênio (Truchot, 1980; Morris et al. 1985). Esses moduladores podem ser substâncias inorgânicas ou orgânicas. A alteração do pH é um dos moduladores da afinidade da hemocianina pelo oxigênio (Tommerdahl, 2015). A hipoxia ambiental pode iniciar a respiração anaeróbica, aumentando os níveis de prótons (H<sup>+</sup>) podendo afetar o equilíbrio ácido-base da hemolinfa, modulando de uma forma negativa em algumas espécies de crustáceos (Mangum, 1983; Truchot, 1992), o que permite que o oxigênio seja liberado mais facilmente nos tecidos.

Fatores ambientais podem também alterar a composição iônica da hemolinfa (Barros et al, 1993; Bonaventura et al. 1980; Miranda, 1994) acarretando em mudanças no transporte do oxigênio hemolinfático. Na espécie *Scyllarides latus* foi verificado em uma modulação negativa com o aumento de Ca<sup>2+</sup> quando exposto a 15°C (Sanna et al., 2004). Tanto o Mg<sup>2+</sup> como o Ca<sup>2+</sup> aumentam a afinidade da hemocianina pelo oxigênio no caranguejo *Carcinus maenas* com o aumento da

temperatura (Truchot, 1975). O íon  $\text{Cl}^-$  possui um efeito positivo na afinidade ao oxigênio em *Penaeus setiferus* e em *C. Maenas* (Brouwer et al. 1978; Truchot, 1975).

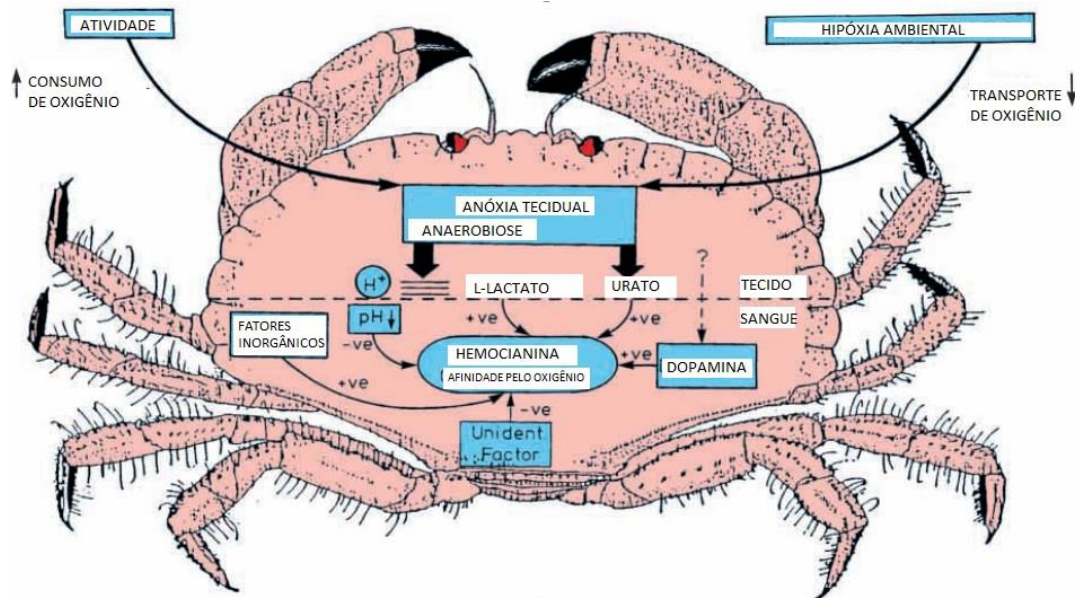


Figura 3: Resumo do impacto dos moduladores na afinidade da hemocianina pelo oxigênio, e as causas de anoxia no tecido. + ve indica um aumento na afinidade do oxigênio e -ve uma diminuição da afinidade do oxigênio. (Adaptação de Bridges & Morris, 1986)

Outros fatores que também podem influenciar na afinidade da hemocianina pelo oxigênio são fatores orgânicos como o urato. O urato é derivado da degradação de purinas e é acumulado sob condições hipóxicas na hemolinfa de crustáceos (Dykens, 1991). Em crustáceos foi verificado que o urato aumenta a afinidade da hemocianina pelo oxigênio (Morris et al. 1985) e foram identificados sítios de ligação de urato na hemocianina (Hellmann et al. 2001).

O lactato também é um fator orgânico modulador da hemocianina. Truchot (1980) verificou o efeito do lactato em *Carcinus maenas* e *Cancer pagurus* quando expostos a hipóxia, demonstrando que o lactato modula de forma positiva a

afinidade com o oxigênio. O lactato é descrito como um modulador alostérico, pois a hemocianina possui um sítio de ligação que interage com o quarto carbono quiral do L-lactato (Graham et al., 1983; Johnson et al., 1984). O aumento do lactato elevou a afinidade da hemocianina pelo oxigênio com o aumento do L-lactato em *C. magister* (Graham et al., 1983), *Carcinus aestuarii* (Hirota et al., 2010), *Callinectes sapidus* (Johnson et al., 1984), *Panulirus interruptus* (Johnson et al., 1987) e *Homarus vulgaris* (Zies et al., 1992). Este mesmo resultado foi encontrado para espécie *Astacus leptodactylus* quando exposto ao aumento da temperatura. (Kölsch et al., 2013). Entretanto, não existem estudos que verifiquem os possíveis efeitos concomitantes da temperatura e da hipóxia nos moduladores da hemocianina em espécies de crustáceos.

O caranguejo semi-terrestre *Neohelice granulata* possui mecanismos fisiológicos adaptativos que permite suportar longos períodos fora d'água a exposição ao ar atmosférico (Mañe-Gazon et al. 1974) como a recirculação da água através da carapaça (Santos et al. 1987). O *N. granulata* é abundante em marismas de estuários e pântanos salgados, a partir do litoral do Rio de Janeiro no Brasil até o Golfo de San Martin, na Argentina (Botto & Irigoyen, 1980; Melo, 1996). Por estarem constantemente expostos em habitats onde há uma variação nos fatores abióticos como temperatura e disponibilidade de oxigênio, o caranguejo *N. granulata* torna-se um bom modelo para o estudo de ajustes em resposta a um estresse ambiental devido a instabilidades abióticas.

No estuário da Lagoa dos Patos já foram observadas variações nas temperaturas no período da primavera (Outubro/Novembro 2004) e verão (Janeiro/Fevereiro 2005) entre de 16°C à 24°C na primavera e de 21°C à 29°C no verão (Odebrecht et al., 2007). Em outro estudo, no período de 1993 à 2012, foi observada uma média de



13°C (mínima 8°C) no inverno, e no verão 25°C (máxima de 30°C) (Haraguchi et al. 2015). Neste ambiente também foram verificadas variações na concentração de oxigênio dissolvido de aproximadamente 12mgO<sub>2</sub>/L a concentrações próximas a zero, com média entre 6mgO<sub>2</sub>/L a 8mgO<sub>2</sub>/L (D'Incao et al. 1992).

Geihs et al. (2013) verificaram que a disponibilidade mínima de oxigênio na água para não haver mortalidade em *N. granulata* é de 3mgO<sub>2</sub>/L e Ayres (2015) verificou que, com pelo menos 24 horas submetido a 3mgO<sub>2</sub>/L, há alterações no metabolismo anaeróbico neste caranguejo, aumentando o lactato e a glicose hemolinfáticos. Miranda, (1994) observou em *N. granulata* que, quando exposto à temperatura de 10°C à 30°C, não há mortalidade. Porém, quando exposto a 35°C o caranguejo é extremamente sensível, quando comparado a outras espécies tropicais como aquelas do gênero *Uca*, onde a temperatura letal está estabelecida entre 39,9°C e 47°C (Teal, 1959; Wilkens & Fingerman, 1965).

Diante disto, o intuito desta dissertação foi investigar quais as alterações que ocorrem regulação da hemocianina em *N. granulata* quando exposto a hipóxia e a temperatura elevada.

## 5. Objetivo

O objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da alta temperatura e da hipoxia na oxihemocianina e possíveis moduladores hemolinfáticos no caranguejo *Neohelice granulata*.

### 5.1. Objetivos específicos

- Determinar a resistência do caranguejo *Neohelice granulata* frente a altas temperaturas;
- Verificar se ocorre alteração no percentual de oxihemocianina e nos possíveis moduladores ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  e lactato hemolinfático) de *N. granulata*, quando expostos à hipóxia moderada e/ou a diferentes temperaturas por 24 e 96h;
- Verificar se ocorre alteração na oxihemocianina e nos possíveis moduladores ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  e lactato hemolinfático), quando o caranguejo é exposto a diferentes temperaturas com exposição a hipóxia severa ( $1mgO_2/L$ ) em animais mantidos a diferentes condições de oxigênio dissolvido ( $6mgO_2/L$  e  $3mgO_2/L$ );

## 6. Artigo

### HEMOCYANIN MODULATION IN RESPONSE TO HYPOXYA AND HIGH TEMPERATURE IN THE CRAB *Neohelice granulata*

Artigo a ser submetido ao periódico: Comparative Biochemistry and Physiology - Part A

Bruna Soares Ayres, Luiz Eduardo Maia Nery, Fábio Everton Maciel\*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av.  
Itália, Km 8, Rio Grande - RS, 96201-900, Brasil.

\*Corresponding author. Fábio Everton Maciel. Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália Km 8, CEP 96201-900, Rio  
Grande, RS - Brazil.

E-mail address: maciel-fe@hotmail.com Tel.: +55 53 3293-5193

## **Abstract**

The crab *Neohelice granulata* is naturally exposed in habitat under varying conditions of temperature and concentration of dissolved oxygen in the water. Abiotic factors are known to affect the affinity of respiratory pigments for oxygen in animals, including crustaceans. Thus, the aim of this work was to verify the effects of high temperature and exposure to hypoxia in the modulation of hemocyanin in the crab *Neohelice granulata*. The animals were submitted to high temperatures for 96h and the mortality was evaluated. In addition, animals were exposed to different temperatures (20°C and 30°C) simultaneously at different oxygen concentrations (6mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> and 3mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>) for 24 and 96h and then at 4h in severe hypoxia (1mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>). We analyzed concentrations of oxyhemocyanin, ions and lactate in hemolymph. The animals exposed at 36°C and 35°C showed 100% of mortality, while at 34°C the maximum mortality of 23.3% in 96 hours; at 33°C no mortality was observed. In the temporal exposure, although there were alterations in the ions, there was no variation in oxyhemocyanin in both conditions. Animals acclimatized at 30°C and 6mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> and posteriorly exposed to 1mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> showed a decrease in the concentrations of oxyhemocyanin, magnesium and lactate while in animals acclimated at 30°C and 3mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> and posteriorly exposed to 1mg O<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> an increase in lactate and oxyhemocyanin occurs. Calcium, chloride and magnesium ions do not appear to be related as modulators under these conditions and while the increase in lactate has been shown to correlate with the increase of oxyhemocyanin. Although these ions are modulators in other species of crustaceans, in the experimental conditions applied did not alter the levels of oxyhemocyanin, while lactate proved to be a possible modulator for this species when the animals previously acclimatized at high temperature and in moderate hypoxia and subsequently exposed to severe hypoxia.

**Key words:** hypoxia, lactate, affinity, hemocyanin and temperature.

### **Introduction**

Hemocyanin in crustaceans is a respiratory pigment composed of six protein subunits (hexamers), and circulating hemocyanin can be composed of one, two, four or eight hexamers (Magnus et al., 1994). Each subunit has an active site containing two copper ions, where oxygen binding occurs (Cuff et al., 1998).

The affinity of hemocyanin for the O<sub>2</sub> is variable and can be modulated by biotic and abiotic factors (Mangum, 1983). Some abiotic factors may induce a change in the affinity of hemocyanin for oxygen and thus modify its transport in hemolymph (Bridges, 2001). Among these factors, the increase in temperature and the decrease in the concentration of dissolved oxygen in water were the most studied (de Fur et al., 1990; Head, 2010). When organisms are exposed to these stressors, there is an increase in the metabolic rate (Vernberg, 1959), generating a state of systemic hypoxia due to the inability to sustain tissue oxygen demand (Pörtner 2001), leading to anaerobic respiration (Truchot, 1992). In some crustaceans a higher affinity of hemocyanin for oxygen was observed when exposed to high temperatures (Powell et al., 2006; Lorenzon et al., 2007) and an increase in respiratory pigment concentration when exposed to a chronic hypoxia (Rathburn et al., 2013).

Changes in hemocyanin affinity for oxygen in situations of environmental changes are due to alterations in modulating substances (Truchot, 1992), which would act positively or negatively, increasing or decreasing affinity respectively (McMahon, 1985). Morris (1990) defined that modulators are substances that respond to environmental conditions or stress by a change in concentration, thus influencing the affinity of hemocyanin for oxygen (Morris et al., 1985).

The ionic composition of hemolymph (Barros et al., 1993) can be altered by temperature and hypoxia inducing changes in hemolymphatic oxygen transport. In the case of crustaceans, some ions are known as possible hemocyanin modulators such as  $\text{Ca}^{2+}$  ions (Kölson et al., 2007),  $\text{Mg}^{2+}$  (Lu et al., 2016) and  $\text{Cl}^-$  (Brouwer et al., 1978). In addition, other factors that may also influence the affinity of hemocyanin for oxygen are organic factors such as urate (Hellmann et al., 2001) and lactate (Truchot, 1980). Truchot (1980) verified the effect on *Carcinus maenas* and *Cancer pagurus* when exposed to hypoxia, demonstrating that lactate modulates positively the affinity of hemocyanin with oxygen. Lactate was described as an allosteric modulator, with specific effect on hemocyanin, whose one of its binding sites of hemocyanin interact with the fourth chiral carbon of L-lactate (Johnson et al., 1984). The increase of hemocyanin affinity by oxygen has been reported for other species of crustaceans such as *Cancer magister* (Graham et al., 1983), *Carcinus aestuarii* (Hirota et al., 2010), *Callinectes sapidus* (Johnson et al., 1984), *Panulirus interruptus* (Johnson et al., 1987) and *Homarus vulgaris* (Zies et al., 1992). This same result was found when *Astacus leptodactylus* was exposed to high temperature (Kölsch et al., 2013). However, to our knowledge describing the possible concomitant effects of temperature and hypoxia on hemocyanin modulators in crustacean species.

The semi-terrestrial crab *Neohelice granulata* is abundant in salt marshes, from the coast of Rio de Janeiro in Brazil to the Gulf of San Martin, Argentina (Botto & Irigoyen, 1980; Melo, 1996). Since crabs are constantly exposed to habitats variable abiotic factors such as temperature and oxygen availability, it is a good model for the study of the physiologic and metabolic adjustments in response to environmental stress caused by abiotic instabilities.

In the laboratory, the minimum oxygen availability in the water in order to avoid mortality is 3mgO<sub>2</sub>/L (Geihs et al., 2013). However, in the marshes of the estuary of Lagoa dos Patos, in the south of Brazil, dissolved oxygen concentration can vary from approximately 12mgO<sub>2</sub>/L to concentrations close to zero (D'Incao et al., 1992). In terms of thermal stress, when *N. granulata* exposed to 30°C there was no mortality, but when exposed to 35°C the crab was extremely sensitive (Miranda, 1994) compared to other tropical species such as the genus *Uca*, where the lethal upper temperature is between 39.9°C and 47°C (Teal, 1959; Wilkens and Fingerman, 1965). In this estuary, variations in maximum temperatures were observed to 30°C in spring and summer (Odebrecht et al., 2007; Haraguchi et al., 2015). In view of this, the aim of this research was to investigate the changes that occur in the affinity of hemocyanin in *N. granulata* when exposed to hypoxia and high temperature, in a combined manner, and if there were changes in the possible modulators.

## **Materials and Methods**

### **Animals**

Adult male crabs (10.2±3g) were collected in the saltmarshes of the city of Rio Grande (Rio Grande do Sul, Brazil). The animals were acclimated in tanks at least 15 days under constant conditions of salinity (20‰), temperature (20°C), photoperiod (12:12) and normoxia (6mgO<sub>2</sub>/L). The animals were fed three times a week with ground beef, and starved for 24 hours before the start of the experiment. After the acclimation period the animals remained with the same conditions of salinity and photoperiod in all the experimental conditions. The crabs were transferred to small aquarium that placed inside a water bath with controlled temperature with thermostat (Fullgauge, Acquaterm/08-TIC-17) and a mercury thermometer was used to monitor the temperature every 2 hours. The concentration of dissolved oxygen was determined

using a portable oximeter (DO-5519, Lutron Electronic Enterprise CO) and the reduction of the dissolved oxygen was done with nitrogen bubbling gas in the water.

## **Experimental procedure**

### **Mortality curve**

The animals (n=10) were submitted to temperatures of 20°C (control), 33°C, 34°C, 35°C and 36°C for 96h in triplicate, with mortality observation every 6h.

### **Effect of temperature and moderate hypoxia for 96h**

The crabs were divided into four experimental groups containing 10 animals each. Two groups were maintained at 6mgO<sub>2</sub>/L and exposed at 20°C (control) and 30°C, and two groups maintained at 3mgO<sub>2</sub>/L (moderate hypoxia) also exposed at 20°C (control) and 30°C. All groups were maintained under these conditions for 96h. Samples of hemolymph (n=5) were collected at times 24 and 96 hours (Fig. 1).

### **Effect of temperature and hypoxia**

The crabs were divided into four experimental groups, two groups were kept at 20°C (control) and two other groups at 30°C, maintained at 6mgO<sub>2</sub>/L for 96h. After this period one group of each treatment was exposed to hypoxia of 1mgO<sub>2</sub>/L for 4h while the other experimental group remained in normoxic conditions for the same period of time. For temperature exposure associated with gradual hypoxic conditions, two groups were maintained at 20°C (control) and two other groups at 30°C both 6mgO<sub>2</sub>/L for 72h. After this period all experimental groups were exposed to 3mgO<sub>2</sub>/L for 24h. At the end of this period one group of each treatment was submitted to severe hypoxia of 1mgO<sub>2</sub>/L while the other experimental group of each treatment remained at 3mgO<sub>2</sub>/L, both for 4h. Hemolymph samples (n=5) were collected from all groups (Fig. 2).



### **Hemolymph sampling**

Samples of hemolymph (300 $\mu$ L) were collected with sterile needle using a 1mL syringe from the sinus at the base of the 4th or 5th pair of pereopods. Hemolymph was centrifuged at 3000 rpm, 4°C for 3 min and stored at -80°C. Samples were analyzed within two weeks after extraction.

### **Oxyhemocyanin concentration**

For the immediate quantification of oxyhemocyanin, after centrifugation, 10 $\mu$ L of hemolymph was diluted in 990 $\mu$ L of buffer (100mM Tris-HCl, pH 7.5) and measured spectrophotometrically at 340nm (Head, 2010; Chen and Cheng, 1995; Kwan et al. 2014). Data were expressed in % of oxyhemocyanin in relation to total protein.

### **Ions and lactate determination**

Total proteins were measured by spectrophotometry at 550nm, chloride and magnesium ions were measured at 490nm and calcium ions at 660nm. For lactate, the hemolymph was diluted in EDTA (6%), and then measured at 340nm. All the analysis was performed using commercial reagents kits (Dole and Kovalent - Brazil) following the manufacturer protocol instructions. Data were expressed in mmol/L.

### **Statistical Analysis**

Data of the mortality curve were adjusted to a non-linear regression and submitted to analysis of survival curves using GraphPad Prism 5.01. Mean values were compared using two-way analyses of variance (ANOVA) followed by the Duncan's test for temporal exposure and for temperature exposure to moderate and severe hypoxia. ANOVA assumptions (normality and homogeneity of variances) were previously verified and mathematical transformations were applied when necessary (Zar, 1984).

## Results

### Mortality curve

Animals exposed at 36°C and 35°C showed 100% mortality in 96h ( $LT_{50} = 6.4h$ ,  $CI_{95}=5.6 - 7.1h$ ,  $LT_{50}=25.7h$ ,  $CI_{95}=23.6 - 27.8h$  respectively) while at 34°C the maximum mortality was 23.3% in 96h. No mortality was observed at 33°C (Fig. 3A). The maximum temperature causing 50% mortality after 96h in the sample ( $LT_{max50}$ ) was calculated at 34.3°C ( $CI_{95} = 34.7 - 34.5^{\circ}C$ ) (Fig.3B).

### Effect of temperature and moderate hypoxia for 96h

The crabs maintained at  $6mgO_2/L$  and exposed to 20°C and 30°C showed no changes in oxyhemocyanin concentration for 24h and 96h (Fig. 4A). Calcium concentrations (Fig. 4B) increased at 24 and 96h compared to 0h at the control temperature 20°C ( $16.2\pm 2.3$ ,  $14.9\pm 1.7$  and  $6.7\pm 1.9$  mmol/L respectively), and at 30°C, calcium levels increased by 24h and returned to initial concentrations at 96h ( $15.4\pm 4.6$  and  $11.7\pm 0.8$  mmol/L respectively). Chloride ions (Fig. 4C) and hemolymphatic lactate concentrations (Fig. 4E) did not observe the difference statistic ( $p>0.05$ ) at both temperatures. Concentrations of magnesium (Fig. D) at 20°C showed a decrease in time 24h returning to normal levels in 96h ( $6.1\pm 0.3$  and  $6.6\pm 0.2$  mmol/L) compared to 0h ( $6.6\pm 0.3$  mmol/L). For the temperature of 30°C, we did not observe difference ( $p>0.05$ ) between the times at the end of experimental time.

In crabs exposed at 20°C and 30°C and moderate hypoxia of  $3mgO_2/L$ , the concentration of oxyhemocyanin (Fig. 5A) and hemolymphatic calcium (Fig. 5B) also did not show significant changes ( $p>0.05$ ) after 24h and 96h of exposure. However, there was a significant increase ( $p<0.05$ ) in chloride concentration (Fig. 5C) when the animal was exposed to 30°C for 96h ( $436.9\pm 32.1$  mmol/L) in relation to 24h

(340.5±36.7 mmol/L). Levels of chloride ions were greater in animals maintained at 20°C (394.3±16.2 mmol/L) in relation to 30°C (340.5±36.7 mmol/L). Magnesium levels (Fig. 5D), an increased at 24h and 96h in the crabs exposed to both temperatures, with 30°C higher values (9.4±0.7 mmol/L for 24h and 10.8±1.1 mmol/L for 96h) than in temperature of 20°C (7.9±0.9 mmol/L for 24h and 12.9±0.4 mmol/L for 96h). Magnesium concentrations was lower in animals exposed at 30°C for 24h when compared to the same time exposure of animals that remained at 20°C while in animals that remained for 96h the magnesium concentration is higher in animals that were exposed to 30°C compared to 20°C for 96 hours. The lactate concentration (Fig. 5E) of the crabs maintained at 30°C decreased ( $p<0.05$ ) in 24h e returned at normals levels at 96h (2.0±0.5 and 3.4±0.3 mmol/L respectively) and 20°C not showed difference significant ( $P>0.05$ ) at 96h. Hemolymphatic lactate values compared to temperatures of 20°C and 30°C was lower at 20°C when exposed for 24h.

### **Effect of temperature and hypoxia**

Crabs exposed to high temperature (30°C) and maintained in normoxia (6mgO<sub>2</sub>/L) for 96h and after that period exposed to severe hypoxia (1mgO<sub>2</sub>/L) for 4h demonstrated differences in hemolymphatic parameters in comparison to the control that remained in normoxia for 4h. A significant decrease ( $p<0.05$ ) was observed in oxyhemocyanin (Fig. 6A) in animals maintained at 30°C and exposed to 1mgO<sub>2</sub>/L (4.6±0.9 %) compared to the group that also remained at 30°C in normoxia (2.6±0.8 %). Calcium and chloride ions not was observed significant differences ( $p>0.05$ ), as showed in the Fig. 6 B and 4 C. There were significant differences ( $p<0.05$ ) in the concentration of magnesium (Fig. 6D) and lactate (Fig. 6E) in the animals exposed at 30°C when exposed to 1mgO<sub>2</sub>/L. In the animals that remained at 20°C, no parameter was significantly ( $p>0.05$ ) altered

when the animals were submitted to severe hypoxia (1mgO<sub>2</sub>/L) compared to animals that remained in normoxia (6mgO<sub>2</sub>/L).

In the crabs maintained at normoxia and 20°C and submitted to moderate hypoxia for 24h and then severe hypoxia (1mgO<sub>2</sub>/L) for 4h was not verified significant differences ( $p>0.05$ ) in oxyhemocyanin (Fig. 7A), calcium (Fig. 7B), chloride (Fig. 7C) and magnesium (Fig. 7D). However, chloride levels decreased ( $p<0.05$ ) in the animals maintained at 20°C submitted to severe hypoxia of 4h (9.1±1.5 mmol/L) compared to animals in moderate hypoxia (10.3±1.4 mmol/L). However, in animals maintained at 30°C exposed for 24h, moderate hypoxia (3mgO<sub>2</sub>/L) followed by severe hypoxia (1mgO<sub>2</sub>/L) presented no significant difference ( $p>0.05$ ) in calcium ions (Fig. 7C and 7D). However, a significant ( $p<0.05$ ) increase in oxyhemocyanin concentration (4.6±0.8 %) was observed in animals submitted to severe hypoxia for 4h compared to animals that remained in moderate hypoxia (2.0±1.2 %) during the experimental period. In addition, a significant increase ( $p<0.05$ ) of 15x were observed in the lactate concentration of animals exposed to severe hypoxia for 4h (24.3±1.9 mmol/L) in relation to animals that remained in moderate hypoxia (1.5±0.6 mmol/L).

## **Discussion**

High temperature conditions are increasing in frequency and duration (Meehl and Tebaldi, 2004; Hansen et al., 2012) in the same way as hypoxic regions have increased (Diaz and Rosenberg, 2008), impacting the physiology of the various animals exposed to these conditions (deFur et al., 1990). The development of thermal tolerance in animals is limited by the ability of oxygen transport, being a condition to maintain oxygen supply and define the upper temperature limit of aquatic animals (Pörtner, 2010) when exposure to thermal stress causes a loss of motor function, compromising the

animal's ecological function (Sunday et al. 2010). However, in tropical species, other factors such as protein dysfunction were responsible for the upper limit temperature (Ern et al, 2014). The thermal sensitivity of the crustaceans is in the range of 0.2-2°C (Lagerspetz and Vainio, 2006) and in species found in Brazil such as *Aratus pisonii*, *Cardisoma guanhumi*, *Pachygrapsus transversus* and *Ucides cordatus* this pattern was observed in 6h exposure (Faria, 2017). The *N. granulata* species showed great vulnerability to the small increase in temperature, with a variation of 1.3°C to reach a LT<sub>50</sub> with a temperature limit higher at 35°C. This species tolerated without presenting mortality up to 3°C above the average temperature at the place where it was collected, where the maximum temperature recorded was 29°C (Odebrecht et al., 2007) and 30°C (Haraguchi et al., 2015). Thus, *N. granulata* seems to be less resistant compared to other species of crabs, such as *Aratus pisonii*, *Cardisoma guanhumi*, *Pachygrapsus transversus* and *Ucides cordatus* (Faria et al., 2017).

Higher temperatures increase the metabolic rate resulting in a greater tissue demand for oxygen, which consequently could alter the hemocyanin concentration as well as alter the oxygen binding properties (Decker & Föll, 2000). Rutledge (1981) found in *Pacifastacus leniusculus* a higher affinity of hemocyanin for oxygen when exposed at 25°C for animals exposed to 20°C and 10°C, as well as *Procambarus clarkii*, *Procambarus zonangulus* acclimated at 30°C in relation to animals acclimated at 10°C and exposed at 30°C (Powell et al., 2006). In hypoxia increased hemocyanin affinity has been described for some species of crustaceans as in *Nephrops norvegicus* (Spicer & Baden, 2001; Baden et al., 2003) and *Callinectes sapidus* (deFur et al., 1990). In *Neohelice granulata* the temperature of 30°C and moderate hypoxia did not alter the oxygen affinity of the hemocyanin although small changes in the possible modulators occurred at 96h. Thus, the time tested and the level of temperature and dissolved O<sub>2</sub> did

not promote changes in O<sub>2</sub> transport. Maciel et al. (2014) observed that this species when submitted to 2mgO<sub>2</sub>/L for 45 min at 20°C did not show changes in circulating glucose and lactate levels, but when submitted to 0.7mgO<sub>2</sub>/L, modifications in these parameters were observed, showing a higher sensitivity to an intense hypoxia.

Hogben and Pinhey (1926; 1927) found that hemocyanin affinity for oxygen in *Homarus* increased in the presence of CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> or SrCl<sub>2</sub>. Morris (1990) also suggests positive modulation by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>+</sup>. Decker and Föll (2000) verified in *Astacus leptodactylus* that changes in temperature resulted in dissociation of hemocyanin induced by pH and/or Ca<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions. The dissociation of hemocyanin was also verified in this species (Kölson et al., 2013) and in *U. pusilla* related to calcium (Paoli et al., 2007). In *P. trituberculatus* (Lu et al., 2016) it was observed that when exposed to high temperatures the concentration of Mg<sup>2+</sup> decreased and the concentration of Ca<sup>2+</sup> increased. In contrast to chloride ions an increase in hemocyanin affinity was observed for *P. setiferus* (Brouwer et al., 1978), *C. maenas* (Truchot, 1975), *M. rosenbergii* (Cheng et al., 2003) and *H. gammarus* (Lorenzo et al., 2007) exposure to hypoxia and high temperature, the chloride level is decreased. In *N. granulata* the magnesium ions increased when the animals were exposed at 20°C and 30°C and 3mgO<sub>2</sub>/L<sup>-1</sup> but there were no changes in oxyhemocyanin, whereas when exposed to 30°C and 6mgO<sub>2</sub>/L and exposed directly to 1mgO<sub>2</sub>/L<sup>-1</sup> decreased the concentration of magnesium and oxyhemocyanin. Although a decrease occurs, animals acclimatized at 20°C and moderate hypoxia and after exposed to severe hypoxia, an increase in magnesium ions was observed, but no alteration in oxyhemocyanin was verified. Ions are hemocyanin modulators in other species of crustaceans, but for the *N. granulata* may not be related as a modulator in these conditions. Ionic changes in hemolymph were related to other physiological functions. For example, magnesium has

an anesthetic effect that causes activity reduction (Waterman, 1941). The increase in temperature (Decker and Föll, 2000) and exposure to hypoxia (Brigdes, 2001) causes changes in pH in aquatic crabs, which may alter the concentration of ions related to acid-base regulation, such as calcium and magnesium from exoskeleton or other sources (Burnett, 1988; Taylor & Waldron, 1997).

Crustaceans appeal to anaerobic metabolism when it approaches its upper thermal limit (Taylor et al., 1973; Taylor et al., 1977; Sommer et al., 1997; Frederich & Pörtner, 2000; Peck et al., 2002; Sokolova & Pörtner, 2003). In *Callinectes sapidus* lactate is an allosteric modulator, with several binding sites in hemocyanin in its different subunits (Johnson et al., 1984). In *Portunus trituberculatus* (Lu et al., 2016), it was found that when subjected to high temperatures the concentration increased (Johnson et al., 1987) and hemocyanin is also allosterically regulated by lactate. Increased lactate levels in *N. granulata* may possibly be one of the strategies for modulating hemocyanin as it correlates with increased oxygen binding in hemocyanin. However, when the crab maintained in normoxia is exposed directly to severe hypoxia it fails to regulate the modulation of oxyhemocyanin. In the estuarine environment, the animals are submitted to changes of oxygen dissolved in the water naturally, where such changes may occur gradually and it was observed that when the *N. granulata* crab was acclimated for 24h to moderate hypoxia and later exposed to severe hypoxia increases the affinity of the hemocyanin by oxygen.

In conclusion, the present study demonstrated that the combination of the different stressors, such as high temperature and hypoxia, alters hemocyanin affinity to oxygen as well as lactate. Therefore, the lactate is a strong candidate to be a hemocyanin modulator in *Neohelice granulata*. However, the observed responses do not occur when crabs were exposed to high temperature only or to high temperature simultaneously

with moderate hypoxia. In addition, this species has no ability to regulate hemocyanin affinity to oxygen when acclimated to high temperature and is exposed directly to severe hypoxia. These results suggest that when crabs suffer from sublethal temperature stress and moderate hypoxia in the environment, they may respond by modulating hemolytic parameters. However, abrupt changes in concomitant oxygen concentration at high temperature are not sufficient to generate modulation.

### **ACKNOWLEDGMENTS**

Brazilian agencies CNPq (455818/2014-2) and FAPERGS (1968- 2551/13-0SIAFEM) supported this project. Ayres, B.S. was a fellow by CAPES. This research was supported by the International Foundation for Science, Stockholm, Sweden, through a grant to Maciel FE (A/ 5352-1).

### **References**

- Baden, S. P., Håkansson, C. L. J., Spicer, J. I. 2003. Between individual variation in haemocyanin concentrations in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to hypoxia and manganese. *Mar. Biol.* 143:267–273.
- Barros, R. M. F., Cruz-Hofling, M. A., Matsuura, M. S. A., 1993. Functional and dissociation and structural organization of the hemocyanin of *Ampullaria canalicutata* (Gastropoda, Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol. B* 105:725-730.
- Bridges, C. R., 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: Properties and physiological implications in a changing world. *J. Exp. Biol.* 204:1021–1032.
- Bonaventura, J., Bonaventura, C. 1980. Hemocyanins: Relationships in their structure, function and assembly. *Am. Zool.* 20:7–17.



- Botto, L.; Irygoyen, H.P., 1980. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) em la desemboadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. Continental de Atlántico Sur. 161-169.
- Brouwer, M., Bonaventura, C., Bonaventura, J. 1977. Oxygen binding by *Limulus polyphemus* hemocyanin: allosteric modulation by chloride ions. Biochemistry. 16:3897–3902.
- Brouwer, M., Bonaventura, C. Bonaventura, J. 1978. Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by the hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. Biochemistry. 12:2148–2154.
- Burnett L.E. 1988. Physiological responses to air exposure: acid-base balance and the role of branchial water stores. American Zoologist. 28:125–135.
- Cheng, W., Liu, C., Kuo, C., 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquac. 220:843–856.
- Childress, J. J.; Seidel, B. A., 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. J. Exp. Biol. 201:1223–1232.
- Cuff, M., Miller K., van Holde, K., Hendrickson, W. 1998. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. J. Mol. Biol. 278:855–70.
- Decker, H., Foll, H. 2000. Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus*. Comp. Biochem. Phys. A 127:147–154.
- deFur, P. L., Mangum, C. P, Reese, J. E. 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. Biol. Bull. 178:46–54.
- Diaz, R. J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. Science. 321:926–929.

- D'Incao, F., Ruffino, M. L., Da Silva, K. G., Braga, A. D., 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda:Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161:179–188.
- Ern, R., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., Madsen, P. T., Wang, T. and Bayley, M. 2015. Some like it hot: thermal tolerance and oxygen supply capacity in two eurythermal crustaceans. *Sci. Rep.* 5:10743.
- Ern, R., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., Wang, T., Bayley M. 2014. Oxygen delivery does not limit thermal tolerance in a tropical eurythermal crustacean. *J. Exp. Biol.* 217:809–814.
- Faria, S.C., Faleiros, R.O., Brayner, F.A., Alves, L.C., Bianchini, A., Romero, C., Buranelli, R.C., Mantelatto, F.L., McNamara, J.C. 2017. Macroevolution of thermal tolerance in intertidal crabs from Neotropical provinces: A phylogenetic comparative evaluation of critical limits. *Ecology and Evolution* 2017:1–10.
- Frederich, M., Pörtner, H. O. 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *Am. J. Physiol.* 279:1531-1538.
- Geihs, M. A., Maciel, F. E., Vargas, M. A., Cruz, B. P., Nery, L. E. M., 2013. Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Exp. Mar. Bio. Eco.* 445:69-78.
- Giomi, F., Beltramini, M. 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: its role in the adaptive plasticity of Crustacea. *Gene.* 389:192–201.
- Graham R. A., Mangum C. P., Terwilliger R. C., Terwilliger N. R. 1983. The effect of organic acids on oxygen binding of hemocyanin from the crab *Cancer magister*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 74:455-50.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R. 2012. Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 109:14726–14727.

- Haraguchi, L., Carstensen, J., Abreu, P. C., Odebrecht, C. 2015. Long-term changes of the phytoplankton community and biomass in the subtropical shallow Patos Lagoon Estuary, Brazil. *East. Coast. S. Science.* 162:76-87.
- Hazes, B., Magnus, K., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K., Hol, W. 1993. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein. Sci.* 2:597–619.
- Head, J. M., 2010. The effects of hypoxia on hemocyanin regulation in *Cancer magister*: Possible role of Hypoxia-Inducible Factor-1 *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386:77–85.
- Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H., 2001. Unusual oxygen binding behavior of a 24-meric crustacean hemocyanin. *A. Biochem. Bioph.* 495:112–121.
- Hirota, S., Tanaka, N., Micetic, I., Di Muro, P., Nagao, S., Kitagishi, H., Kano, K., Magliozzo, R. S., Peisach, J., Beltramini, M., Bubacco, L. 2010 Structural basis of the lactate dependent allosteric regulation of oxygen binding in arthropod hemocyanin. *J. Biol. Chem.* 285:19338–19345.
- Hogben, L. T. & Pinhey, K. F. 1926. A comparison between the dissociation of the haemocyanins of *Helix* and Crustacea. *Brit. J. Exp. Biol.* 4:203-214.
- Johnson, B. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., 1984. Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-lactate. *Biochemistry* 23:872–878.
- Johnson, B. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J. 1987. Determination of L-lactate binding stoichiometry and differences in allosteric interactions of structurally distinct homohexamers from *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta.* 916:376–380.
- Lagerspetz Y. H. K., Vainio, L.A. 2006. Thermal behaviour of crustaceans. *Biol. Rev.* 81:237–258.

- Larimer, J. L., Riggs, A. F. 1964. Properties of Hemocyanins I. The effect of calcium ions on the oxygen equilibrium of crayfish hemocyanin. *Comp. Biochem. Physiol.* 13:3543.
- Lorenzon, S., Giulianini, P.G., Martinis, M., Ferrero, E.A. 2007. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* A 147:94–102.
- Lu, Y., Wang, F., Li, L., Dong, L. 2016. Responses of metabolism and haemolymph ions of swimming crab *Portunus trituberculatus* to thermal stresses: a comparative study between air and water. *Aquac. Res.* 47:2989–3000.
- Kölsch, A., Hörnemann, J., Wengenroth, C., Hellmann, N. 2013. Differential regulation of hexameric and dodecameric hemocyanin from *A. leptodactylus*. *Biochimica Biophysica Acta.* 183:1853–1859.
- Magnus, K., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Hol, W. 1994. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins* 19:302–9.
- Mangum, C. P. 1983. Oxygen transport in the blood. *The Biology of the Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation.* 5:373–429.
- Markl, J., Decker, H. 1992. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv Comp. Environ. Phys.* 13:325–76.
- McMahon, B. R., 1985. Functions and functioning of crustacean hemocyanin. In *Respiratory Pigments in Animals – Relation, Structure, Function.* Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. 35–58.

- Meehl, G. A., Tebaldi, C. 2004. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science*. 305:994–997.
- Melo, G. A. S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo. Plêiade. *Fapesp*. 137:91–115.
- Miranda, R. B., 1994. Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a ionorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil. 171. Master Thesis.
- Morris, S. 1990. Organic ions as modulators of respiratory pigment function during stress. *Physiol. Zool*. 63:253–287.
- Morris S., Bridges C. R., Grieshaber M. K. 1985. A new role for uric acid: modulator of hemocyanin oxygen affinity in crustaceans. *J. exp. Zool*. 235:135-139.
- Nery, L. E. M., Santos, E. A., Bianchini, A., Gonçalves, A. A. 1993. Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. *Brazillian J. Med. Biol. Res*. 26:1291-1296.
- Odebrecht, C., Abreu, P. C., Bemventuri, C. C., Copertino, M., Muelbert, J. H., Vieira, P., Seeliger, U., 2007. Short term variability of chlorophyll a and phytoplankton composition in a shallow area of the Patos lagoon estuary (Southern Brasil). *Atlântica, Rio Grande*, 29:93-106.
- Paoli, M, Giomi F, Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H., Di Muro, P., Beltramini, M. 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: Structural and functional

- properties of the 4×6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea). *Gene* 398:177–182.
- Peck, L. S., Pörtner, H. O. and Hardewig, I. 2002. Metabolic demand, oxygen supply, and critical temperatures in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75:123-133.
- Pörtner, H. O., 2001. Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88:137–146.
- Pörtner, H. O. 2010. Oxygen and capacity limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881-893.
- Powell, M. L., Watts, S. A., 2006. Effect of temperature acclimation on metabolism and hemocyanin binding affinities in two crayfish, *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus*. *Comp. Biochem. Physiol A* 144:211–217.
- Rathburn, C. K., Sharp, N. J., Ryan, J. C., Nealy, M., Cook, M., Chapman, R. W., Burnett, L. E., Burnett, K. G. 2013. Transcriptomic responses of juvenile Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to hypoxia and hypercapnic hypoxia. *Physiol. Genomics.* 45:794–807.
- Rutledge, P. S., 1981. Effects of temperature acclimation on crayfish hemocyanin oxygen binding. *Am. J. Physiol.* 40:93–98.
- Sanna, M.T., Olianias, A., Castagnol, M., Sollai, L., Manconi, B., Salvadori, S., Giardina B., Pellegrini M. 2004. Oxygen-binding modulation of hemocyanin from the slipper lobster *Scyllarides latus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139:261–268.

- Spicer, J. I., Baden, S. P., 2001. Environmental hypoxia and haemocyanin variability in Norway lobsters *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar. Biol.* 139:727–734.
- Sokolova, I. M., Pörtner, H. O. 2003. Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *J. Exp. Biol.* 206, 195-207.
- Sommer, A., Klein, B. and Pörtner, H. O. 1997. Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). *J. Comp. Physiol. B* 167:25-35.
- Taylor, E. W., Butler, P. J. and Al-Wassia, A. 1977. Some responses of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities. *J. Comp. Physiol. B* 122:391-402.
- Taylor, H. H. & Waldron F. M. 1997. Respiratory responses to air-exposure in the southern rock lobster, *Jasus edwardsii* (Hutton) (Decapoda: Palinuridae). *Marine and Freshwater Research.* 48:889–898.
- Taylor, E. W., Whiteley, N. M., 1989. Oxygen transport and acid–base balance in the haemolymph of the lobster, *Homarus gammarus*, during aerial exposure and resubmersion. *J. Exp. Biol.* 144:417–436.
- Teal, J. M., 1959. Respiration of crabs in Georgia salt marshes and its relation to their ecology *Physiol. Zool.* 32:1-14.
- Truchot, J.P., 1975. Factors controlling the in vitro and in vivo oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas*. *Respir. Physiol.* 24:173-189.

- Truchot, J. P. 1980. Lactate increases the oxygen affinity of crab haemocyanin. *J. Exp. Zool.* 214:205–208.
- Truchot, J.P., 1992. Respiratory function of arthropod hemocyanins. *Adv. Comp. Env. Physiol.* 13:377–410.
- van Holde K., Miller K. 1982. Haemocyanins. *Q. Rev. Biophys.* 15:1–129.
- Vernberg, F. J., 1959. Studies on the physiological variation between tropical and temperate zone fiddler crabs of the genus *Uca*: III. The influence of temperature acclimation on oxygen consumption of whole organisms. *Biol. Bull.* 117:582–593.
- Verria, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossaa, D., Mandal, P. K., Ingrossob, L., Zonnoa, V., Vilellab, S., Ahearnc, G. A., Srorelli, C. 2001. D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol. A* 130:585-606.
- Waterman, T.H. 1941. A comparative study of the effects of ions on whole nerve and isolated single nerve fiber preparations of crustacean neuromuscular systems. *J. Cell. Comp. Physiol.* 18:109–126.
- Weiland, A.L., Mangum, C.P., 1975. The influence of environmental salinity on hemocyanin function in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J. Exp. Zool.* 193:265-273.
- Wilkens, J. L., Fingerman, M., 1965. Salt tolerance and temperature relationships of the fiddler crab, *Uca pugilator*, with reference to body coloration. *Biol. Bull.* 128:133-141.



Zeis, B., Nies, A., Bridges, C., Grieshaber, M. 1992. Allosteric modulation of hemocyanin oxygen affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Specific and additive effects on haemocyanin oxygen affinity. J. Exp. Biol. 168:93–110.

### Captions to figures

**Figure 1:** Representative scheme of the effect of temperature and moderate hypoxia for 96h.

**Figure 2:** Representative scheme of the effect of temperature and hypoxia.

**Figure 3:** A) Mortality rate of the crab *Neohelice granulata* exposed to different temperatures (33°C, 34°C, 35°C, 36°C) for 96h. Filled dots – 36°C, empty dots – 35°C, filled squares – 34°C, and empty squares 33°C. Experiments were done in triplicate (n=10). Data are mean ± standard error. B) Upper thermic limit of *N. granulata* calculated from A). Each dot refers to mean ± standard error.

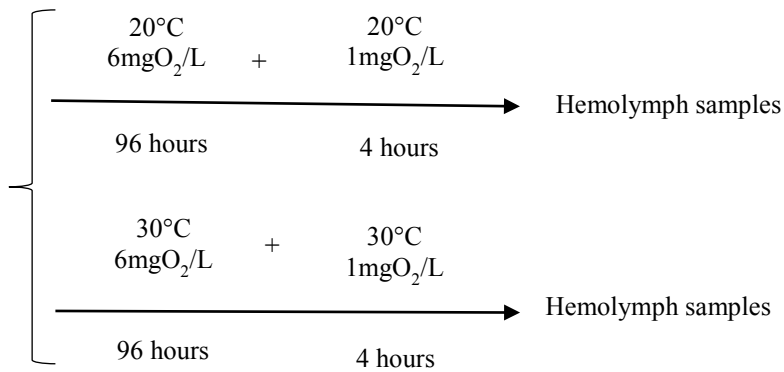
**Figure 4:** Oxyhemocyanin percentage (A) and concentrations of calcium (B), chloride (C), magnesium (D) and lactate (E) in the hemolymph of the crab *N. granulata* exposed for 24h and 96h at 20°C (white bars) and 30°C (black bars) under normoxia (6 mgO<sub>2</sub>/L). The bars represent the mean ± standard error (n=5). Different letters indicate significant differences among groups (p<0.05).

**Figure 5:** Oxyhemocyanin percentage (A) and concentrations calcium (B), chloride (C), magnesium (D) and lactate (E) in the hemolymph of the crab *Neohelice granulata* exposed for 24h and 96h at 20°C (white bars) and 30°C (black bars) in moderate hypoxia (3 mgO<sub>2</sub>/L). Data are mean ± standard error (n=5). Different letters indicate significant differences among groups (p<0.05).

**Figure 6:** Oxyhemocyanin percentage (A) and concentrations calcium (B), chloride (C), magnesium (D) and lactate (E) in the hemolymph of the crab *Neohelice granulata* acclimatized for 96h at 20°C or at 30°C under normoxia (6 mgO<sub>2</sub>/L) exposed to normoxia (white bars) or severe hypoxia (1 mgO<sub>2</sub>/L - black bars) for 4h. Data are mean ± standard error (n=5). Different letters indicate significant differences among groups (p<0.05).

**Figure 7:** Oxyhemocyanin percentage (A) and concentrations calcium (B), chloride (C), magnesium (D) and lactate (E) in the hemolymph of the crab *Neohelice granulata* acclimated to 20°C or 30°C for 72h under normoxia and after 24h under moderate hypoxia (3 mgO<sub>2</sub>/L) and submitted of moderate hypoxia (white bars) or severe hypoxia (1 mgO<sub>2</sub>/L - black bars) for 4h. Data are mean ± standard error (n=5). Different letters indicate significant differences among groups (p<0.05).

**Figure 1**



**Figure 2**

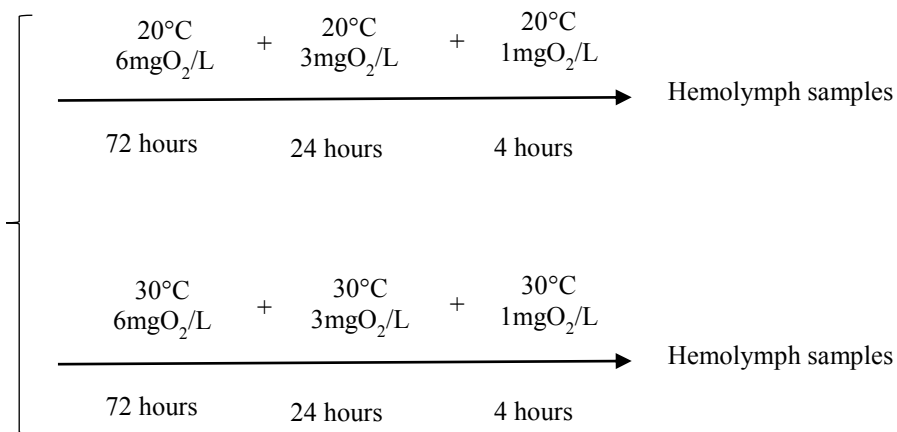
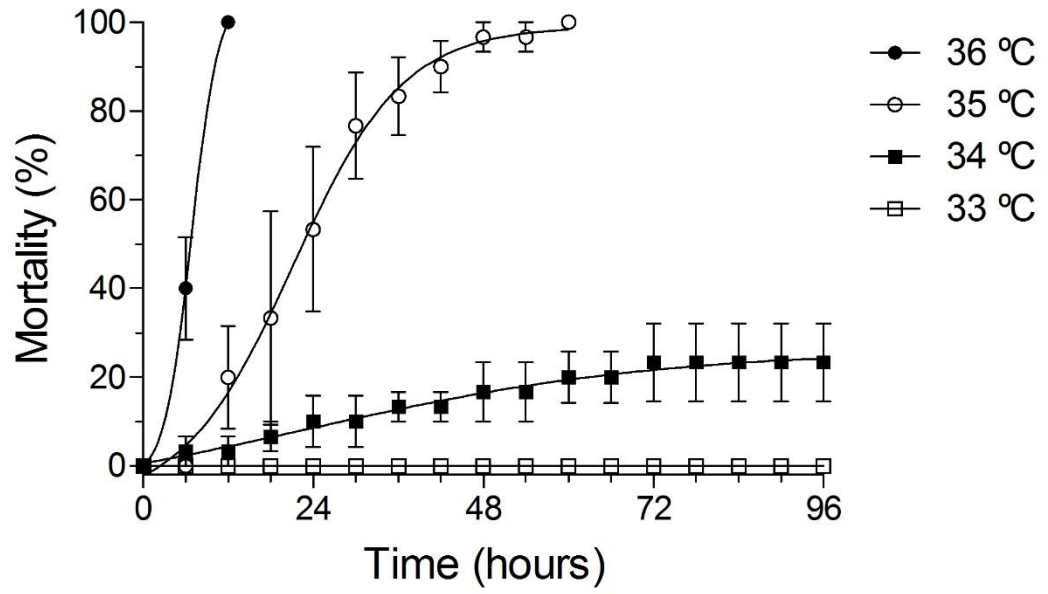
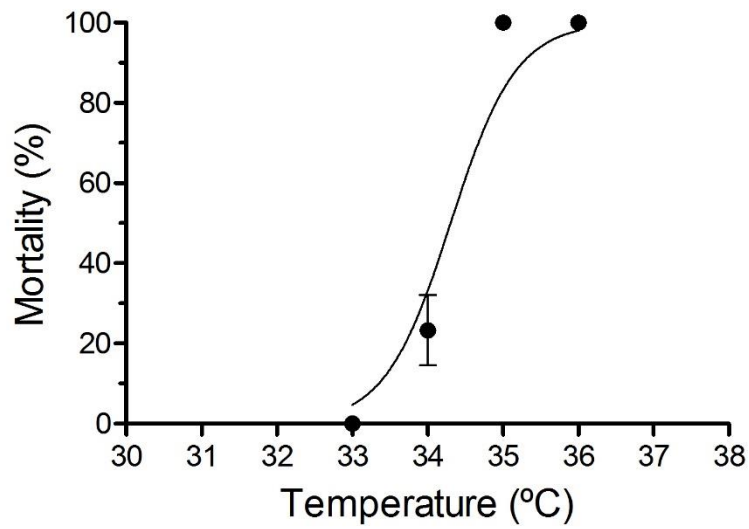


Figure 3

A)

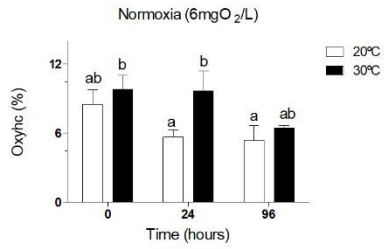


B)

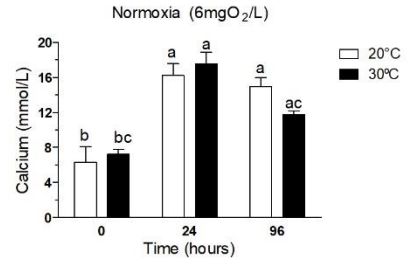


**Figure 4**

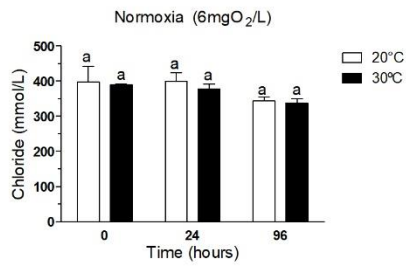
**A)**



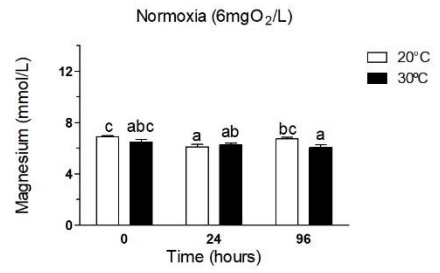
**B)**



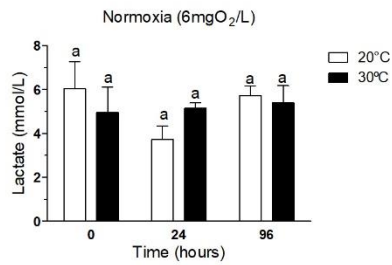
**C)**



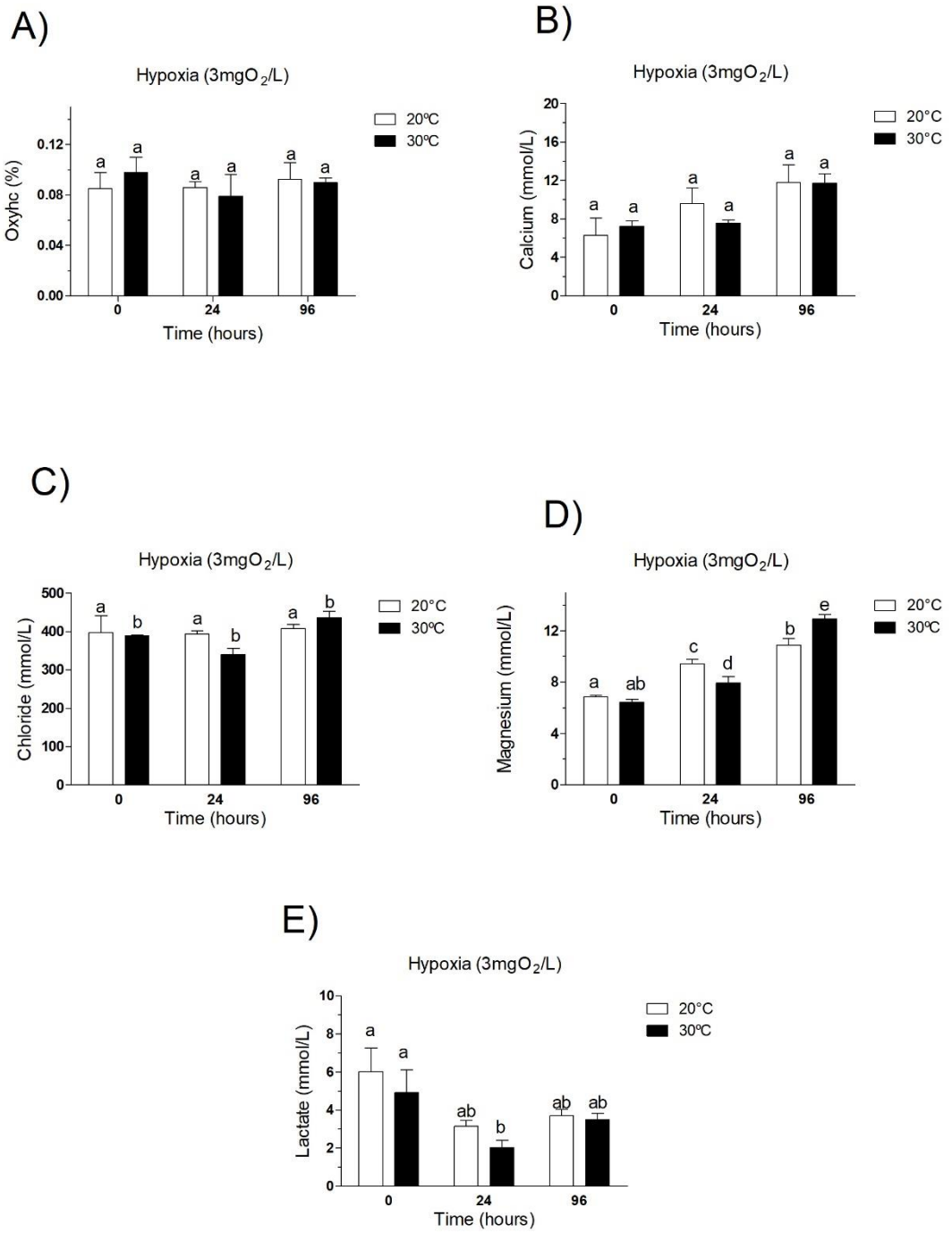
**D)**



**E)**

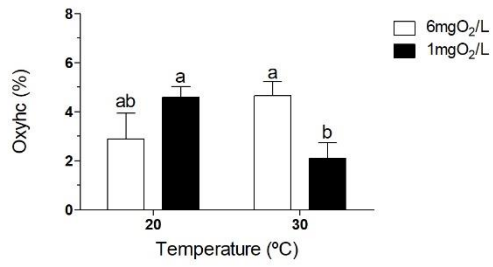


**Figure 5**

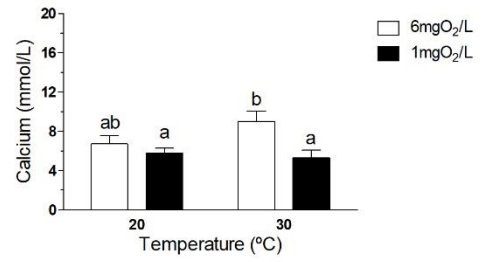


**Figure 6**

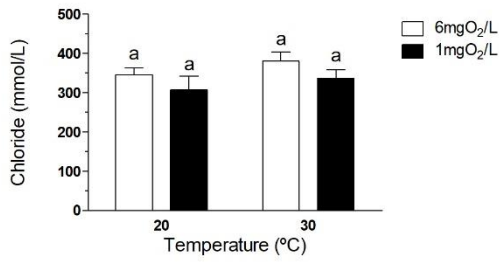
**A)**



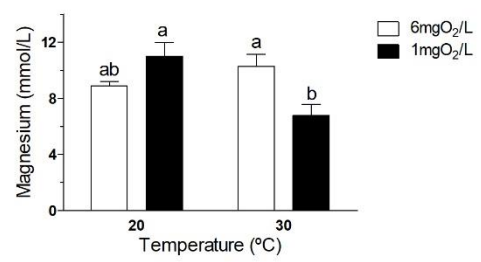
**B)**



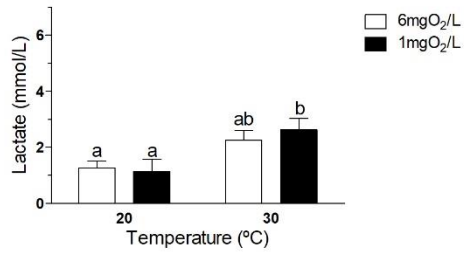
**C)**



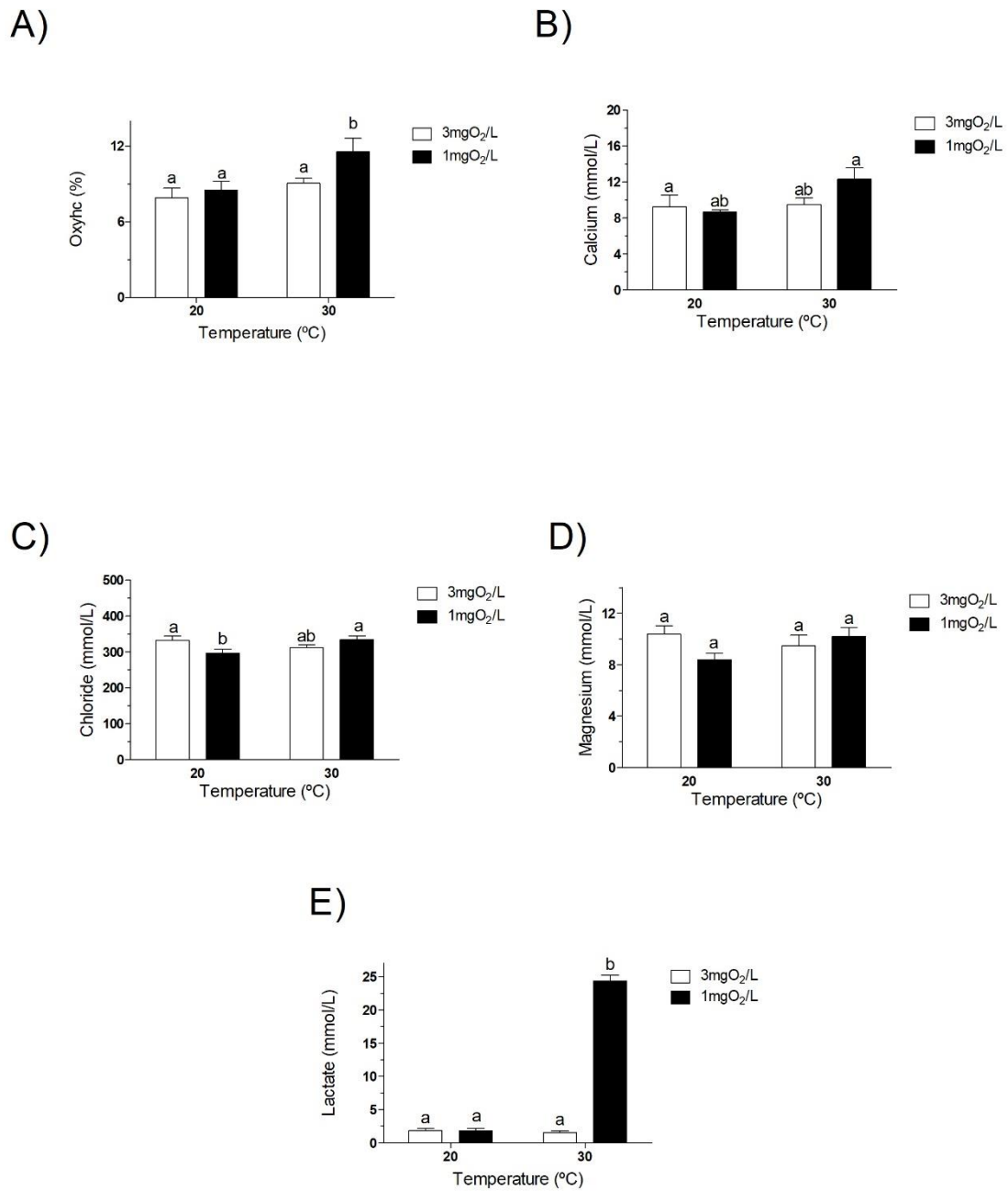
**D)**



**E)**



**Figure 7**



## 6. Discussão Geral

Condições de elevadas temperaturas estão aumentando em frequência e duração (Meehl & Tebaldi 2004; Hansen et al., 2012) do mesmo modo que regiões hipóxicas têm aumentado (Diaz & Rosenberg, 2008), impactando a fisiologia dos vários animais

expostos a estas condições (deFur et al., 1990). A espécie *N. granulata* demonstrou uma grande vulnerabilidade ao pequeno aumento da temperatura, com uma variação de 1.3°C para atingir uma  $LT_{50}$  com limite de temperatura superior em 35°C. Apesar de tolerar um pequeno aumento na temperatura, o caranguejo *N. granulata* apresentou um maior tempo de resistência a 35°C. Esta espécie tolerou sem apresentar mortalidade até 3°C acima do evidenciado do local onde foi coletado, onde a máxima registrada foi de 29°C (Odebrecht et al., 2007) e 30°C (Haraguchi et al. 2015). Entretanto, é uma espécie menos resistente comparado a outras espécies de caranguejos, como as espécies *Aratus pisonii*, *Cardisoma guanhumi*, *Pachygrapsus transversus* e *Ucides cordatus* (Faria et al., 2017).

Altas temperaturas podem alterar as propriedades de ligação ao oxigênio, bem como alterar a conformação da hemocianina (Decker & Föll, 2000), levando a um aumento na afinidade da hemocianina pelo oxigênio (deFur et al., 1990). Em algumas espécies de crustáceos, como em *Pacifastacus leniusculus* (Rutledge, 1981), *Procambarus clarkii*, *P. zonangulus* (Powell et. al., 2006), é verificado o aumento da afinidade da hemocianina pelo oxigênio quando os animais são expostos a altas temperaturas. Isto também é verificado em *Nephrops norvegicus* (Spicer & Baden, 2001; Baden et al., 2003) e *Callinectes sapidus* (deFur et al., 1990) quando expostos a hipóxia. Em *N. granulata*, a temperatura de 30°C e a hipóxia moderada não alteraram a afinidade da hemocianina pelo oxigênio apesar de ocorrer pequenas alterações nos possíveis moduladores em 96h. Assim, o tempo testado e o nível de temperatura e  $O_2$  dissolvido não promoveram alterações no transporte de  $O_2$ . Maciel et al. (2014) observaram que esta espécie, quando submetida á 2mg $O_2$ /L por 45 min à 20°C não mostrou alterações nos níveis de glicose e lactato circulantes, mas quando submetido à



0.7mgO<sub>2</sub>/L, modificações nestes parâmetros foram observadas, demonstrando uma sensibilidade maior à uma hipóxia mais intensa.

Alterações em íons hemolinfáticos também podem alterar a afinidade da hemocianina pelo oxigênio. Íons de cálcio, cloro e magnésio já foram descritos como sendo modulares positivos em crustáceos (Morris, 1990; Decker & Föll, 2000; Cheng et al., 2003; Paoli et al., 2007; Kölson et al., 2013; Lu et al., 2016; Truchot, 1975). Em *N. granulata*, os íons de magnésio aumentam quando os animais estão expostos a 20°C e 30°C e 3mgO<sub>2</sub>/L, mas não há alteração na oxihemocianina, enquanto que quando expostos a 20°C e 30°C e 6mgO<sub>2</sub>/L e expostos diretamente a 1mgO<sub>2</sub>/L diminuíram a concentração de magnésio hemolinfático e da oxihemocianina. Íons são moduladores da hemocianina em outras espécies de crustáceos, porém para a espécie *N. granulata* não parece estar relacionado como moduladores nessas condições. As alterações iônicas na hemolinfa podem estar relacionadas com as outras funções fisiológicas destes íons. Por exemplo, o magnésio desencadeia um efeito da redução de atividade exploratória (Waterman, 1941).

Crustáceos recorrem ao metabolismo anaeróbico quando se aproximam do seu limite térmico superior (Taylor et al., 1973; Taylor et al., 1977; Sommer et al., 1997; Frederich & Pörtner, 2000; Peck et al., 2002; Sokolova & Pörtner, 2003). Em *Callinectes sapidus* o lactato é um modulador alostérico, com vários locais de ligação na hemocianina em suas diferentes subunidades (Johnson et al., 1984). Em *Portunus trituberculatus* (Lu et al., 2016), foi verificado que, quando submetidos a altas temperaturas, houve um aumento da concentração de lactato e (Johnson et al., 1987), sendo que nesta espécie a hemocianina também é regulada alostericamente pelo lactato. O aumento do lactato em *N. granulata* possivelmente pode ser uma das estratégias utilizadas para modulação da hemocianina, visto que este se correlaciona com o

aumento da ligação ao oxigênio na hemocianina. Além do efeito do lactato, o pH também está relacionado com a alteração da afinidade da hemocianina como verificado para alguns crustáceos. Porém, quando o caranguejo proveniente de normóxia é exposto direto a hipóxia severa, não consegue regular a modulação da oxihemocianina. No ambiente estuarino, os animais estão naturalmente submetidos a alterações de oxigênio dissolvido na água, onde tais alterações podem ocorrer gradualmente. De fato, foi observado que, quando o caranguejo *N. granulata* é aclimatado por 24h a hipóxia moderada e posteriormente exposto a hipóxia severa existe um aumento da afinidade da hemocianina pelo oxigênio, bem como o aumento da concentração de lactato.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a combinação de diferentes estressores, como alta temperatura e hipóxia moderada previamente à uma exposição a hipóxia severa, influencia no aumento da afinidade da hemocianina pelo oxigênio, bem como provoca alteração na concentração de lactato, um forte candidato à modulador para essa espécie. Porém, as respostas observadas não ocorrem quando os caranguejos são expostos a alta temperatura apenas ou a alta temperatura combinação com a hipóxia moderada. Além disso, esta espécie não apresenta capacidade de regular a afinidade da hemocianina pelo oxigênio quando é aclimatada a alta temperatura e exposta diretamente a uma hipóxia severa. Estes resultados sugerem que, quando os caranguejos sofrem estresse por temperatura subletal e hipóxia moderada no meio ambiente, eles podem responder modulando parâmetros hemolinfáticos. Contudo, mudanças abruptas na concentração de oxigênio combinações com o aumento da temperatura não são suficientes para gerar respostas de modulação.

A partir destes resultados, uma série de novas questões surge. Uma destas questões é se além do lactato, o pH também está relacionado com a alteração da afinidade da hemocianina como verificado para alguns crustáceos. Outra questão é se, quando

submetido a condições de aclimação a hipóxia moderada e alta temperatura, o caranguejo *N. granulata* aumenta a tolerância e a resistência quando submetidos a baixas concentrações de oxigênio dissolvido e se estes moduladores estariam envolvidos na regulação da afinidade da hemocianina. Adicionalmente, um estudo das subunidades da hemocianina em função da temperatura e hipóxia seriam de grande valia para melhor entendimento destas respostas.

## 7. Bibliografia Geral

- Abreu, P. C., Bergesch, M., Proença, L. A., Garcia, C.A.E., Odebrecht, C., 2010. Short and long-term chlorophyll a variability in the shallow microtidal Patos Lagoon estuary, Southern Brazil. *Estuaries Coasts*. 33:554-569.
- Almeida, M. T.; Baumgarten, M. G. Z., Rodrigues, R. 1993. Identificação das possíveis fontes de contaminação das águas que margeiam a cidade do Rio Grande-RS. Rio Grande: FURG. 34. (Série Documentos Técnicos 06 - Oceanografia. FURG).
- Ayres, B. A., Nery, L. E. M., Maciel, F. E. 2015. Efeito da aclimação à hipóxia moderada na sobrevivência e no metabolismo energético do Caranguejo *Neohelice granulata*. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil. Trabalho de conclusão de curso.
- Baden, S. P., Håkansson, C. L. J., Spicer, J. I. 2003. Between individual variation in haemocyanin concentrations in the Norway lobster *Nephrops norvegicus* following exposure to hypoxia and manganese. *Mar. Biol.* 143:267–273.
- Baird, D., Christian, R. R., Peterson, C. H., Johnson, G. A., 2004. Consequences of hypoxia on estuarine ecosystem function: Energy diversion from consumers to microbes. *Ecol. Appl.* 14:805–822.

- Barros, R. M. F., Cruz-Hofling, M. A., Matsuura, M. S. A., 1993. Functional and dissociation and structural organization of the hemocyanin of *Ampullaria canalicutata* (Gastropoda, Mollusca). *Comp. Biochem. Physiol. B* 105:725-730.
- Baumgarten, M. G. Z., Paixão, B. E. G. 2001. Uso do índice do estado trófico para avaliar a qualidade das águas do estuário da Lagoa dos Patos (RS). *Revista Atlântica.FURG.* 23: 101–116.
- Bishop, M. J. 2006. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 70:15–422.
- Bridges, C. R., 2001. Modulation of haemocyanin oxygen affinity: Properties and physiological implications in a changing world. *J. Exp. Biol.* 204:1021–1032.
- Bridges, C. R., Morris, S. 1986. Modulation of haemocyanin oxygen affinity by L-lactate – a role for other cofactors. *Invertebrate Oxygen Carriers.* 341–352.
- Bonaventura, J., Bonaventura, C. 1980. Hemocyanins: Relationships in their structure, function and assembly. *Am. Zool.* 20:7–17.
- Botto, L.; Irygoyen, H.P., 1980. Bioecología de la comunidad del cangrejal I. contribución al conocimiento biológico del cangrejo de estuario *Chasmagnathus granulata* Dana (Crustacea, Decapoda, Grapsidae) em la desemboadura del rio Salado, provincia de Buenos Aires. *Continental de Atlántico Sur.* 161-169.
- Brouwer, M., Bonaventura, C., Bonaventura, J. 1977. Oxygen binding by *Limulus polyphemus* hemocyanin: allosteric modulation by chloride ions. *Biochemistry* 16:3897–3902.
- Brouwer, M., Bonaventura, C. Bonaventura, J. 1978. Analysis of the effect of three different allosteric ligands on oxygen binding by the hemocyanin of the shrimp, *Penaeus setiferus*. *Biochemistry* 12:2148–2154.
- Cameron, W. M., Pritchard, D. W., 1963. *Estuaries.* M. N. Hill (ed.). The Sea. John Wiley & Sons, New York. II 306–324.
- Cheng, W., Liu, C., Kuo, C., 2003. Effects of dissolved oxygen on hemolymph parameters of freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac.* 220:843–856.
- Childress, J. J.; Seidel, B. A., 1998. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. *J. Exp. Biol.* 201:1223–1232.

- Coates, J. C., Bradford, E. L., Krome C. A., Nairn, J., 2012. Effect of temperature on biochemical and cellular properties of captive *Limulus polyphemus*. *Aquaculture* 334–337.
- Cooper, A. W., 1974. Salt marshes. Coastal ecosystems of the United States. The Conservation Foundation. 11:55-98.
- Cuff, M., Miller K., van Holde, K., Hendrickson, W. 1998. Crystal structure of a functional unit from Octopus hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 278:855–70.
- Decker H., Föll, H. 2000. Temperature adaptation influences the aggregation state of hemocyanin from *Astacus leptodactylus*. *Comp. Biochem. Phys. A* 127:147–154.
- Decker, H., Hellmann, N., Jaenicke, E., Lieb, B., Meissner, U., Markl, J. 2007. Iterative Comp. *Biol.* 47:631–644.
- deFur, P. L., Mangum, C. P., Reese, J. E. 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biol. Bull.* 178:46–54.
- Deutsch, C. A., Tewksbury, J. J., Huey, R. B., Sheldon, K. S., Ghalambor, C. K., Haak, D. C., Martin, P. R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:6668-6672.
- Diaz, R. J., 2001. Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Qual.* 30:275–281.
- Diaz, R. J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science.* 321:926–929.
- Duarte, H., Tejado, M., Katzenberger, M., Marangoni, F., Baldo, D., Beltrán, J.F., Martí, D. A., Richert-Boix, A., Gonzalez-Voyer, A. 2012. Can amphibians take the heat? Vulnerability to climate warming in subtropical and temperate larval amphibian communities. *Global Change Biology.* 18:412–421.
- Dykens, J. A., 1991. Purineolytic capacity and origin of hemolymph urate in *Carcinus maenas* during hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. B* 98:579-582.
- D'Incao, F., Ruffino, M. L., Da Silva, K. G., Braga, A. D., 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda:Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161:179–188.

- Ellerton N., Ellerton, H. 1982. Quaternary structure of arthropod hemocyanins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:1383–7.
- Engel, D. W., Brouwer, M., McKenna, S. 1993. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93:235–244.
- Faria, S.C., Faleiros, R.O., Brayner, F.A., Alves, L.C., Bianchini, A., Romero, C., Buranelli, R.C., Mantelatto, F.L., McNamara, J.C. 2017. Macroevolution of thermal tolerance in intertidal crabs from Neotropical provinces: A phylogenetic comparative evaluation of critical limits. *Ecology and Evolution* 2017:1–10.
- Frederich, M., Pörtner, H. O. 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*. *Am. J. Physiol.* 279:1531-1538.
- Geihs, M. A., Maciel, F. E., Vargas, M. A., Cruz, B. P., Nery, L. E. M., 2013. Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Exp. Mar. Bio. Eco.* 445:69-78.
- Giomi, F., Beltramini, M. 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: its role in the adaptive plasticity of Crustacea. *Gene.* 389:192–201.
- Graham R. A., Mangum C. P., Terwilliger R. C., Terwilliger N. R. 1983. The effect of organic acids on oxygen binding of hemocyanin from the crab *Cancer magister*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 74:45550.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R. 2012. Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 109:14726–14727.
- Haraguchi, L., Carstensen, J., Abreu, P. C., Odebrecht, C. 2015. Long-term changes of the phytoplankton community and biomass in the subtropical shallow Patos Lagoon Estuary, Brazil. *East. Coast. S. Science.* 162:76-87.
- Hartnoll, R. G., 1964. The freshwater Grapsid crabs of Jamaica. *Proc.Soc. London.* 175:145-169.
- Hartnoll, R. G., 1988. Evolution, systematic and geographical distribution. *Biology of land crabs.* New York. Cambridge University Press. 6-54.

- Hazes, B., Magnus, K., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z., Kalk, K., Hol, W. 1993. Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18Å resolution: clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein. Sci.* 2:597–619.
- Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H., 2001. Unusual oxygen binding behavior of a 24-meric crustacean hemocyanin. *A. Biochem. Bioph.* 495:112–121.
- Head, J. M., 2010. The effects of hypoxia on hemocyanin regulation in *Cancer magister*: Possible role of Hypoxia-Inducible Factor-1. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 386:77–85.
- Hirota, S., Tanaka, N., Micetic, I., Di Muro, P., Nagao, S., Kitagishi, H., Kano, K., Magliozzo, R. S., Peisach, J., Beltramini, M., Bubacco, L. 2010 Structural basis of the lactate dependent allosteric regulation of oxygen binding in arthropod hemocyanin. *J. Biol. Chem.* 285:19338–19345.
- Huey, R. B. 1991. Physiological consequences of habitat selection. *Am. Nat.* 137:91-115.
- Johnson, B. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., 1984. Allosteric modulation of *Callinectes sapidus* hemocyanin by binding of L-lactate. *Biochemistry* 23:872–878.
- Johnson, B. A., Bonaventura, C., Bonaventura, J. 1987. Determination of L-lactate binding stoichiometry and differences in allosteric interactions of structurally distinct homohexamers from *Panulirus interruptus* hemocyanin. *Biochim. Biophys. Acta* 916:376–380.
- Kölsch, A., Hörnemann, J., Wengenroth, C., Hellmann, N. 2013. Differential regulation of hexameric and dodecameric hemocyanin from *A. leptodactylus*. *Biochimica Biophysica Acta.* 183:1853–1859.
- Lima, T. M., Geihs, M. A., Maciel, F. E., Nery, L. E. M., 2015. Preference to air exposition of an estuarine crab when exposed to hypoxic water. *Physiol. & Behav.* 151:97–101.
- Lorenzon, S., Giulianini, P.G., Martinis, M., Ferrero, E.A. 2007. Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physio. A* 147:94–102.
- Lu, Y., Wang, F., Li, L., Dong, L. 2016. Responses of metabolism and haemolymph ions of swimming crab *Portunus trituberculatus* to thermal stresses: a comparative study between air and water. *Aquac. Res.* 47:2989–3000.

- Magnus, K., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Hol, W. 1994. Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins*. 19:302–9.
- Markl, J., Decker, H. 1992. Molecular structure of the arthropod hemocyanins. *Adv Comp. Environ. Phys.* 13:325–76.
- Mañe-Gazon, F., Dei-Cas, E., Espector, B. H., Leymonte, J., 1974. Estudios sobre la biología del cangrejo de estuário *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851: I osmorregulación frente a câmbios de salinidad. *Physis. Sec. A* 33:163-171.
- Mangum, C. P. 1983. Oxygen transport in the blood. *The Biology of the Crustacea. Internal Anatomy and Physiological Regulation.* 5:373–429.
- Mangum, C. P. 1994. Subunit composition of hemocyanins of *Callinectes sapidus*: phenotypes from naturally hypoxic waters and isolated oligomers. *Comp. Biochem. Physiol. B* 108:537–541.
- McMahon, B. R., 1985. Functions and functioning of crustacean hemocyanin. In *Respiratory Pigments in Animals – Relation, Structure, Function*. Berlin. Heidelberg: Springer-Verlag. 35–58.
- Meehl, G. A., Tebaldi, C. 2004. More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science*. 305:994–997.
- Melo, G. A. S., 1996. Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral brasileiro. São Paulo. Plêiade. Fapesp. 137:91–115.
- Miranda, R. B., 1994. Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a ionorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil. 171. Master Thesis.
- Morris, S. 1990. Organic ions as modulators of respiratory pigment function during stress. *Physiol. Zool.* 63:253–287.
- Morris S., Bridges C. R., Grieshaber M. K. 1985. A new role for uric acid: modulator of hemocyanin oxygen affinity in crustaceans. *J. exp. Zool.* 235:135-139.



- Nery, L. E. M., Santos, E. A., Bianchini, A., Gonçalves, A. A. 1993. Effects of crustacean hyperglycemic hormones from *Carcinus maenas* and *Orconectes limosus* on blood and muscle glucose and glycogen concentration of *Chasmagnathus granulata*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 26:1291-1296.
- Odebrecht, C., Abreu, P. C., Bemventuri, C. C., Copertino, M., Muelbert, J. H., Vieira, P., Seeliger, U., 2007. Short term variability of chlorophyll a and phytoplankton composition in a shallow area of the Patos lagoon estuary (Southern Brasil). *Atlântica, Rio Grande*, 29:93-106.
- Paoli, M, Giomi F, Hellmann, N., Jaenicke, E., Decker, H., Di Muro, P., Beltramini, M. 2007. The molecular heterogeneity of hemocyanin: Structural and functional properties of the 4×6-meric protein of *Upogebia pusilla* (Crustacea). *Gene* 398:177–182.
- Peck, L. S., Pörtner, H. O. and Hardewig, I. 2002. Metabolic demand, oxygen supply, and critical temperatures in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Physiol. Biochem. Zool.* 75:123-133.
- Pörtner, H. O., 2001. Climate change and temperature dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88:137–146.
- Pörtner, H. O., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. A* 132:739–761.
- Pörtner, H. O., Peck, L., Somero, G. 2007. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative review. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362:2233-2258.
- Powell, M. L., Watts, S. A., 2006. Effect of temperature acclimation on metabolism and hemocyanin binding affinities in two crayfish, *Procambarus clarkii* and *Procambarus zonangulus*. *Comp. Biochem. Physiol A* 144:211–217.
- Rabalais, N. N., Díaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D., Zhang, J. 2010. Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia. *Biogeosciences*. 7:585–619.
- Rathburn, C. K., Sharp, N. J., Ryan, J. C., Nealy, M., Cook, M., Chapman, R. W., Burnett, L. E., Burnett, K. G. 2013. Transcriptomic responses of juvenile Pacific whiteleg shrimp,

- Litopenaeus vannamei*, to hypoxia and hypercapnic hypoxia. *Physiol. Genomics*. 45:794–807.
- Roessig, J. M., Woodley C. M., Cech Jr. J. J., Hansen, L. J. 2004. Effects of global climate change on marine and estuarine fishes and fisheries. *Fish Biology and Fisheries*. 14:251–275.
- Rutledge, P.S., 1981. Effects of temperature acclimation on crayfish hemocyanin oxygen binding. *Am. J. Physiol.* 40:93–98.
- Sanna, M.T., Olianias, A., Castagnol, M., Sollai, L., Manconi, B., Salvadori, S., Giardina B., Pellegrini M. 2004. Oxygen-binding modulation of hemocyanin from the slipper lobster *Scyllarides latus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139:261–268.
- Santos, E. A., Baldisseroto, B., Bianchini, A., Colares, E. P., Nery, L. E. M., Manzini, G. C., 1987. Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol. A* 88:21–25.
- Santos, M.C.F., Moreira, G.S., 1991. *Rev. Brasil. Biol. A* 87:1033-1035.
- Sokolova, I. M., Pörtner, H. O. 2003. Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. *J. Exp. Biol.* 206, 195-207.
- Sommer, A., Klein, B. and Pörtner, H. O. 1997. Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L). *J. Comp. Physiol. B* 167:25-35.
- Spicer, J. I., Baden, S. P., 2001. Environmental hypoxia and haemocyanin variability in Norway lobsters *Nephrops norvegicus* (L.). *Mar. Biol.* 139:727–734.
- Taylor, E. W., Butler, P. J. and Al-Wassia, A. 1977. Some responses of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) to progressive hypoxia at different acclimation temperatures and salinities. *J. Comp. Physiol. B* 122:391-402.
- Taylor, E. W., Whiteley, N. M., 1989. Oxygen transport and acid–base balance in the haemolymph of the lobster, *Homarus gammarus*, during aerial exposure and resubmersion. *J. Exp. Biol.* 144:417–436.

- Taylor, H. H., Greenaway, P., Morris, S. 1993. Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab *Birgus latro* L. VIII. Osmotic and ionic regulation on freshwater and saline drinking regimens. *J. Exp. Biol.* 179:93-113.
- Teal, J. M., 1959. Respiration of crabs in Georgia salt marshes and its relation to their ecology *Physiol. Zool.* 32:1-14.
- Tommerdhl, A. P., Burnett, K. G., Burnett, L. E. 2015. Respiratory properties of hemocyanin from wild and aquacultured penaeid shrimp and the effects of chronic exposure to hypoxia *Biol. Bull.* 228: 242–252.
- Truchot, J.P., 1975. Factors controlling the in vitro and in vivo oxygen affinity of the hemocyanin in the crab *Carcinus maenas*. *Respir. Physiol.* 24:173–189.
- Truchot, J. P. 1980. Lactate increases the oxygen affinity of crab haemocyanin. *J. Exp. Zool.* 214:205–208.
- Truchot, J.P., 1992. Respiratory function of arthropod hemocyanins. *Adv. Comp. Env. Physiol.* 13:377–410.
- van Holde K., Miller K. 1982. Haemocyanins. *Q. Rev. Biophys.* 15:1–129.
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *PNAS.* 105:15452–15457.
- Verity, P. G., Alber, M., Bricker, S. B., 2006. Development of hypoxia in well-mixed subtropical estuaries in the Southeastern USA. *Estuaries and Coasts.* 29:665.
- Vernberg, F. J., 1959. Studies on the physiological variation between tropical and temperate zone fiddler crabs of the genus *Uca*: III. The influence of temperature acclimation on oxygen consumption of whole organisms. *Biol. Bull.* 117:582–593.
- Volbeda A, Hol W. 1989. Crystal structure of hexameric hemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2Å resolution. *J. Mol. Biol.* 209:249–79.
- Waterman, T.H. 1941. A comparative study of the effects of ions on whole nerve and isolated single nerve fiber preparations of crustacean neuromuscular systems. *J. Cell. Comp. Physiol.* 18:109–126.

Wilkens, J. L., Fingerman, M., 1965. Heat tolerance and temperature relationships of the fiddler crab, *Uca pugilator*, with reference to body coloration. Biol. Bull. 128:133-141.

Zeis, B., Nies, A., Bridges, C., Grieshaber, M. 1992. Allosteric modulation of hemocyanin oxygen affinity by L-lactate and urate in the lobster *Homarus vulgaris*. I. Specific and additive effects on haemocyanin oxygen affinity. J. Exp. Biol. 168:93–110.