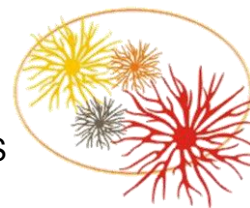




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



ACLIMATAÇÃO A ALTA TEMPERATURA ALTERA O COMPORTAMENTO DE
EMERSÃO DO CARANGUEJO *Neohelice granulata*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lamia Marques Halal

Rio Grande, RS, Brasil

Maio 2018

ACLIMATAÇÃO A ALTA TEMPERATURA ALTERA O COMPORTAMENTO DE
EMERSÃO DO CARANGUEJO *Neohelice granulata*

POR

Lamia Marques Halal

Dissertação apresentada
ao programa de Pós-
Graduação em Ciências
Fisiológicas da
Universidade Federal de
Rio Grande (FURG) como
parte dos requisitos para
obtenção do título de
Mestre em Ciências
Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery

DEDICO:

Aos meus pais e minha avó, por todo incentivo.

Agradecimentos:

Primeiro, gostaria de agradecer à Deus, que me deu forças para concluir esse trabalho. Aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar e me deram todo o suporte para eu investir na carreira acadêmica. À minha vó que hoje está no céu junto com o meu pai, olhando por mim e mandando as melhores energias. À minha família, que sempre torceu pela minha vitória. E não posso deixar de mencionar os meus irmãozinhos de 4 patas: Kira, Lua e Bóris, que me fizeram companhia ao longo das inúmeras horas de trabalho em casa, e deixaram esse momento mais divertido.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery por aceitar me orientar, por todo tempo que investiu na minha formação, antes da minha entrada como aluna regular do mestrado, para me ensinar o mais básico que devemos saber para fazer Ciência. Sou muito grata por toda a paciência que o senhor teve comigo, pelas diversas explicações, por tudo que me ensinou e por sempre instigar o meu pensamento crítico, nas nossas discussões.

Ao Prof. Dr. Fabio Everton Maciel, que sempre esteve disposto contribuir com o esse trabalho, através de discussões e me oferecendo todo suporte para eu trabalhar no laboratório.

À Danusa Leindes que me apresentou os laboratórios, e intermediou meu primeiro contato com o *Neohelice*, e com toda paciência me ensinou a coletar e manipular os caranguejos. À Tabata, por estar sempre disposta a me auxiliar em todo o meu trabalho, e mesmo “do outro lado do mundo”, extremamente atarefada, conseguiu achar um tempinho pra me ajudar.

À Bruna Ayres, que apesar de esquecer uma mangueirinha ou outra fora dos aquários, sempre esteve disposta a me ajudar, permitindo que eu fosse dormir em casa em algumas noites, durante os experimentos.

À Nicole Medeiros, amiga desde a graduação, pelas diversas coletas, companhia presencial ou através do whatsapp quando eu precisava “dormir” no ICB, durante as intermináveis curvas de sobrevivência. Nossas conversas me deixavam mais leve, muito obrigada!

À Caroline Souto, por toda sempre estar disposta a me ajudar nos experimentos, e por todas as trocas de conhecimento, além de todas rizadas nos momentos de descontração.

Aos amigos, Raquel Martins e Guilherme Limberger, pela parceria tão forte que construímos durante nosso mestrado. Agradeço por estarmos sempre juntos, comemorando nossas conquistas e algumas vezes lamentando, com muito bom humor, a presença de Murphy nos nossos experimentos. Com certeza a companhia de vocês tornou essa jornada muito mais agradável. À colombiana mais fofa do mundo, a amiga Jéssica Sanchez, por toda sua paciência quando me ensinou a usar o software que sempre dava problemas comigo e funcionava perfeitamente com ela, e por toda risada que demos juntas. Ao pessoal da salinha 1, pelas trocas de experiência e pelos momentos de comilança e descontração.

À todos os professores e técnicos do ICB pelos ensinamentos, e por nos oferecerem o melhor ambiente de trabalho possível.

À dona Maria, por fazer o café mais cheiroso do mundo, e por me tratar com tanto carinho, aquele cheirinho era o maior estímulo para eu pular do colchão. À porteira Inês, pelas boas conversas nas noites que eu dormia no ICB, por ser uma pessoa de luz, sempre com uma palavra de carinho e ter a sensibilidade de falar tudo que precisava ouvir.

À banca pelo aceite, pelas contribuições com esse trabalho, que certamente ficará bem melhor com as colaborações de vocês.

Minha gratidão a todos!

Sumário

LISTA DE FIGURAS	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT	3
1.Introdução Geral.....	4
1.1.Mudanças climáticas.....	5
1.2. Populações Estuarinas	7
1.3.Lagoa dos Patos	8
1.4. Impacto das mudanças climáticas nos seres vivos	10
1.4.1 Aclimação térmica.....	12
1.4.2 Termorregulação comportamental.....	14
1.5 O caranguejo <i>Neohelice granulata</i>	15
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. Manuscrito.....	20
Abstract.....	22
1.Introduction	23
2.Methodology	25
3.Results	27
4.Discussion.....	35
5. Acknowledgments	40
6. References.....	40
4. Discussão geral.....	44
5. Referências Bibliográficas.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1– Efeito Estufa.....	06
FIGURA 2 – Lagoa dos Patos.....	08
FIGURA 3 – Localização Marismas.....	09
FIGURA 4 -- <i>Neohelice granulata</i>	15
FIGURA 5 – Recirculação de água através da carapaça do <i>Neohelice granulata</i>	16

Manuscrito

FIGURE 1 – Upper thermal limit of acclimated crabs at 20°C and 30°C.....	28
FIGURE 2 – Mortality curves of acclimated crabs at 20°C and 30°C.....	28
FIGURE 3 – Behavior profile of <i>N. granulata</i> , acclimated at 20°C, exposed to high temperatures.....	31
FIGURE 4 – Behavior profile of <i>N. granulata</i> , acclimated at 30°C, exposed to high temperatures.....	32
FIGURE 5 – Total time that <i>N. granulata</i> , acclimated at 20°C and 30°C, in the aerial environmental.....	34
FIGURE 6 – Number and frequency of <i>N. granulata</i> emersions, acclimated at 20°C and 30°C.....	34
FIGURE 7 – Frequency of locomotion of <i>N. granulata</i> , acclimated at 20°C and 30°C in the air environment exposed to high temperatures.....	35

RESUMO:

Halal, Lamia Marques. Aclimação a alta temperatura altera o comportamento de emersão do caranguejo *Neohelice granulata*. 2018. 66 páginas.

Dissertação de Mestrado. Programa, de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal do Rio Grande- FURG.

Ambientes costeiros apresentam flutuações térmicas diárias e sazonais. Tendo em vista que a temperatura influencia diversos processos fisiológicos, os animais devem evitar situações de estresse térmico. A temperatura dos animais heterotérmicos oscila de acordo com as alterações térmicas ambientais, e esses animais precisam evitar que sua temperatura corpórea chegue à faixa de temperaturas críticas, prejudicando seus processos homeostáticos. Contudo, para avaliar o limite térmico de um animal, é necessário levar em consideração sua história térmica, bem como a temperatura que ele foi aclimatado/aclimatizado, pois os limites térmicos podem variar de um indivíduo para outro dentro da mesma espécie. Muitos animais evadem de ambientes onde vivenciam estresse térmico, deslocando-se em direção a ambientes onde a temperatura é favorável para a manutenção da homeostasia. Diante do exposto, o intuito inicial desse trabalho foi avaliar se o comportamento de emersão e a temperatura de aclimação são capazes de aumentar a tolerância e a resistência ao aumento de temperatura de caranguejos semiterrestres, como *Neohelice granulata*. Além disso, verificamos se o aumento da temperatura e o processo de aclimação térmica alteram o comportamento de emersão desse animal. Para tanto, estimamos a temperatura letal para 50% da população (TL₅₀) de *N. granulata* através de curvas de mortalidade. Animais aclimatados a 20°C e 30°C foram submetidos a altas temperaturas totalmente submersos ou com a possibilidade de emersão, onde a temperatura do ar estava próxima, ou bem mais baixa do que a temperatura da água. A mortalidade foi verificada a cada 2 horas por 96 horas. Monitoramos a movimentação de *N. granulata* aclimatados a 20°C e 30°C em 3 zonas (aérea, intermediária e aquática). A aclimação a uma temperatura mais alta aumentou a tolerância e resistência de *N. granulata* e o comportamento de emersão permitiu que esses caranguejos sobrevivessem a temperaturas mais altas. A aclimação à alta temperatura concomitante a possibilidade de emergir aumentou ainda mais a tolerância e resistência desses caranguejos ao estresse térmico. Quando *N. granulata* aclimatados a 20°C tiveram a possibilidade de emergir da água com temperatura mais elevada, eles permaneceram por mais tempo no ambiente aéreo independente se a temperatura estava mais baixa ou próxima à temperatura da água, e permaneceram por um longo período na zona aérea e evitaram o contato com a água. Todos os animais aclimatados a 30°C permaneceram predominantemente no ambiente aéreo. No entanto, os animais do controle

30°C e os animais submetidos à água a 35°C com a possibilidade de emergir para o ar quente transitaram mais entre a água e a zona aérea, permanecendo menos tempo na zona aérea quente a cada emersão do que os animais que poderiam emergir para o ambiente aéreo fresco. Concluimos assim, que a aclimação térmica e o comportamento de emersão foram capazes de aumentar a tolerância dos animais para altas temperaturas e que o comportamento de emersão é alterado pela alta temperatura.

Palavras-chave: Crustáceo; Limite térmico; Termotolerância; Termorregulação; Exposição Aérea

ABSTRACT:

Coastal environments present daily and seasonal thermal fluctuations. Considering that the temperature influences several physiological processes, animals necessarily avoid situations of thermal stress. The temperature of the heterothermal animals oscillates according to the thermal environmental changes, and these animals need to avoid that their body temperature reaches the temperature range critical, damaging their homeostatic processes. However, in order to evaluate the thermal limit of an animal, it is necessary to take into account its thermal history, as well as the temperature that was acclimated/acclimatized, since the thermal limits can vary from one individual to another within the same species. Many animals escape from environments where they experience thermal stress and move towards environments where the temperature is favorable for the maintenance of homeostasis. In view of the above, the initial purpose of this work was to evaluate if the emergence behavior and the acclimation temperature are capable of increasing the tolerance and the resistance to temperature increase of semiterrestrial crabs, such as *Neohelice granulata*. In addition, we verify whether if the temperature increase and the thermal acclimation process alter the emersion behavior of this animal. We estimated the lethal temperature for 50% of the population (LT₅₀) of *N. granulata* through mortality curves. Animals acclimated at 20°C and 30°C were subjected totally submerged to high temperatures or with the possibility of emersion, where the air temperature was near or much lower than the water. The mortality was verified every 2 hours per 96 hours. We monitor the movement of *N. granulata* acclimated at 20°C and 30°C in 3 environments (aerial, intermediate and aquatic). Acclimation at high temperature at a higher temperature increased the tolerance and resistance of *N. granulata* and the emergence behavior allowed these crabs to survive higher temperatures. Acclimation concomitant with the possibility of emergence further increased the tolerance and resistance of these crabs to thermal stress. When *N. granulata* acclimated at 20°C had the possibility of emerge from the water with higher temperature, they remained longer time in the aerial environment independent of air temperature avoiding contact with water. All animals acclimated at 30°C remained predominantly in the aerial environment. However, control animals 30°C and animals submitted to water at 35°C with the possibility of emerging into hot air transited more between the water and the aerial zone, remaining less time at each emersion in the hot air environment than the animals that could emerge into the fresh air environment. We conclude that thermal acclimation and emergence behavior were able to increase the tolerance of the animals to high temperatures and that high temperature modify emergent behavior.

Keywords: Crustacean; Thermal limit; Thermotolerance; Thermoregulation; Air Exposure

1. Introdução Geral:

1.1. Mudanças climáticas:

Estudos apontam que a temperatura da Terra está aumentando devido a intensificação das mudanças climáticas (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012), que apesar de serem próprias do sistema climático terrestre, são influenciadas pela ação antrópica. Estima-se que a interferência humana começou a ser mais relevante a partir do século XIX, após a revolução industrial, onde a utilização de combustíveis fósseis aumentou consideravelmente e a emissão de gases causadores do efeito estufa (gás carbônico, metano, óxido nitroso e compostos de clorofluorcarbono) aumentou na mesma proporção (Bettiol, 2017).

O efeito estufa é um mecanismo natural do planeta para manutenção da temperatura da superfície terrestre, onde uma parcela da radiação solar refletida pela Terra é absorvida por gases presentes na atmosfera, consequentemente, evitando a perda de calor do planeta (figura 1). Esse processo é extremamente importante, pois, na sua ausência calcula-se que a temperatura média do planeta seria 33°C menor que a atual (Conti, 2011), impossibilitando a vida, como conhecemos hoje. O que vem sendo visto como um problema é o agravamento desse processo, ocasionado pelo aumento de emissão de gases estufa que altera a composição da atmosfera, aumentando a tendência em absorver a radiação infravermelha, acarretando na intensificação do efeito estufa natural, o que acarreta no fenômeno conhecido como aquecimento global, causado principalmente pela ação do homem no meio ambiente. Além da emissão de gases estufa, outras atividades antrópicas como desmatamento e queimadas podem agravar esse problema climático (Alcantra *et al.*, 2012).

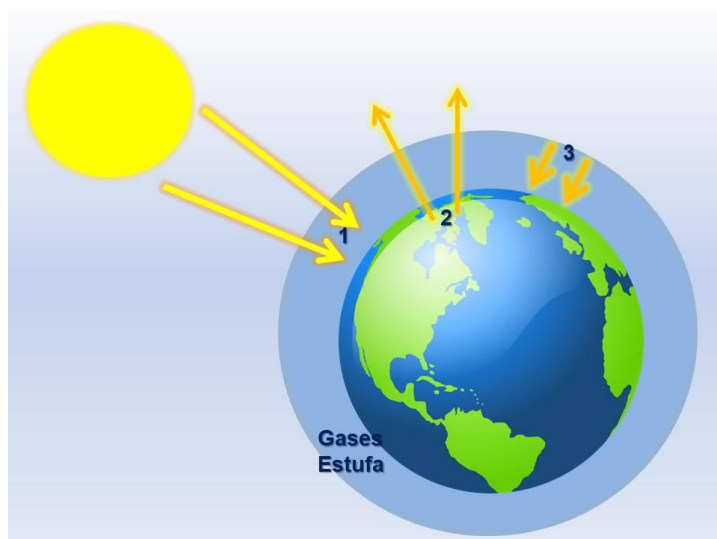


Figura1. A energia do sol atravessa a atmosfera e aquece a Terra (1). Parte dessa energia é refletida (2) e grande parte dessa energia é retida pelos gases de efeito estufa (3).

De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), desde 1750 a concentração dos gases de efeito estufa aumentou na atmosfera consideravelmente, levando a elevação de 0,6°C a 2,0°C na temperatura média do ar na superfície do planeta somente no século XX. Além disso, estimativas do IPCC indicam que ocorrerá um aumento da ordem de 1,4°C (otimista) a 5,8°C (pessimista) nas médias térmicas globais para o período de 1990 a 2100 (Alcantra *et al.*, 2012). Quanto às temperaturas máxima e mínima, Easterling e colaboradores (1997) afirmam que há uma tendência de aumentar em 0,88 e 1,86°C, respectivamente, até o final deste século, além deste fato, estudos apontam que houve um considerável aumento nas temperaturas máxima (0,141°C dec⁻¹) e mínima (0,204°C dec⁻¹) entre o ano de 1979 e 2004 (Vose *et al.*, 2005). A região sul do nosso país também experimenta esta realidade, onde foi identificado aumento de mais de 0,7°C, com mudanças principalmente nas mínimas (Mendonça, 2006).

1.2. Populações Estuarinas:

Estuários são corpos de água conectados ao mar, quando a maré está alta, a água do mar penetra no canal do estuário, misturando-se com a água doce e na maré baixa a água do mar recua pelo mesmo canal. Portanto, esses ambientes são considerados ecossistemas de transição entre rio e oceano. Dessa forma, a água do mar é diluída pela água doce (Cameron e Pritchard, 1963 apud Valle-Levinson, 2010; Bokuniewicz, 1995), através de um gradiente horizontal de salinidade, onde geralmente a salinidade é inversamente proporcional a proximidade da costa (Valle-Levinson, 2010), e influenciada pela vazão fluvial, ondas, marés e também pelo vento, resultando em um ambiente com água salobra.

A atividade das populações que compõe diversos estuários é normalmente programada ciclicamente (anual, sazonal, lunar, diária e mareal). Os ciclos de fatores ambientais como a intensidade da radiação solar, o comprimento do dia, a maré, a salinidade e a temperatura normalmente influenciam no comportamento dos animais das populações que vivem ou utilizam os estuários, pois seus ciclos de vida são geralmente associados ao ciclo desses fatores ambientais (Kennish 1986).

Estima-se que os estuários, como os demais ambientes costeiros, são os mais afetados pelas mudanças climáticas (Muehe e Neves, 2009; Pinto-Coelho e Havens, 2016). Esses ambientes estão suscetíveis tanto a mudanças no continente, como no oceano. Dentre os principais efeitos que atingem os ambientes costeiros estão o aumento do nível do mar, as alterações no clima de ventos e ondas que atuam de forma sinérgica, ampliando os impactos sobre esse ambiente (Santos, 2012). Os animais que vivem em ambientes estuarinos são considerados por viverem próximo aos seus limites térmicos (Foster, 1969).

Como comentado anteriormente, os estuários são ambientes suscetíveis a constantes variações na temperatura e os organismos que ali habitam devem estar preparados a enfrentar essas situações e empregar estratégias para sobreviver nesse ambiente. Em condições mais estressantes nesses

ambientes estão os animais que habitam a zona entre marés, que podem sofrer mudanças abruptas de temperatura, devido a oscilação da maré que pode induzir oscilação de períodos de exposição aérea com períodos submersos (Vernberg e Vernberg, 2012). Esses ambientes sofrem rápidas mudanças biogeográficas (Barry *et al.*, 1995), portanto é importante entender como as espécies que habitam esse ambiente serão afetadas com as mudanças climáticas.

1.2. Lagoa dos Patos:

A Lagoa dos Patos, localizada no Rio Grande do Sul é a maior lagoa costeira do mundo, com 201.626 km² (Kjerfve 1986), e pode ser dividida em 5 habitats: Rio Guaíba, Saco de Tapes, Lagoa do Casamento, Corpo Central Lagunar e o Estuário que perfaz aproximadamente 10% (971km²) dessa laguna (Asmus 1997) (figura 2).



Figura 2. Lagoa dos Patos e suas principais unidades biológicas: 1. Rio Guaíba; 2. Lagoa do Casamento; 3. Corpo Central Lagunar; 4. Saco de Tapes e 5. Estuário. Fonte: Google Maps.

O estuário da Lagoa dos Patos é constituído principalmente por dois ambientes: as baías costeiras e rasas que abrangem cerca de 80% do estuário, e por um corpo de água central e profundo (Bonilha e Asmus, 1994). Um dos muitos microhabitats localizados nas baías costeiras que compõe esse estuário são as marismas que perfazem uma área 70 km², fracionada em 24 unidades

entre as cidades de Rio Grande e São José do Norte (figura 3) (Costa e Davy, 1992).



Figura 3: Localização da Lagoa dos Patos. Áreas escuras apontam a localização das 24 unidades de marismas no estuário. Fonte: Marangoni e Costa (2009).

Frequentemente ocorrem mudanças na temperatura e na salinidade do estuário da Lagoa dos Patos, que são determinadas principalmente pela temperatura do ar, pelo regime de chuvas e pela ação dos ventos (Vilas Boas, 1990). De fato, a temperatura variou de 16 a 24°C na primavera de 2004 e de 21 à 29°C no verão de 2005 (Fujita e Odebrecht, 2007). Além disso, em 19 anos de pesquisa (de 1993 a 2012), observou-se que as temperaturas médias aumentam de 13°C no inverno para 25°C no verão, chegando a muitas vezes a 30°C (Haraguchi *et al.*, 2015) evidenciando a oscilação na estrutura termal desse estuário.

A região das marismas da Lagoa dos Patos abriga diversas espécies de animais. A principal espécie animal que vive nesse ambiente é o caranguejo *Neohelice granulata*, que é normalmente acompanhado pelo anfípodo *Orchestia platensis*, e pelos poliquetas *Laonereis acuta* e *Hetermatus similis* e

eventualmente pelo caranguejo *Uca uruguayensis* (Capítoli *et al.*, 1978). O caranguejo *N. granulata* possui uma grande importância ecológica nesse ambiente, pois esse animal participa da manutenção dos ciclos biogeoquímicos, através da bioturbação e dos hábitos alimentares exercendo uma grande influência na composição da biomassa do seu habitat. Além de ser uma espécie chave na cadeia alimentar do ecossistema onde está inserido (Fanjul *et al.*, 2011; Alberti *et al.*, 2015), *N. granulata* também desempenha um papel importante na estrutura da meiofauna como um todo, sua presença influencia a disponibilidade de poliquetas às aves demonstrando como a atividade desse caranguejo pode acarretar numa maior heterogeneidade nesse ambiente (Escapa *et al.*, 2004; Rosa e Bemvenuti, 2005).

1.4. Impacto das mudanças climáticas nos seres vivos:

Alguns animais, como aves e mamíferos, são capazes de manter a temperatura corporal numa faixa de constância independente da temperatura ambiental e são classificados como termorreguladores (Bennett e Ruben, 1979). Um dos principais fatores para isso é que esses animais possuem uma alta taxa metabólica e são capazes de manter sua temperatura elevada pela produção interna de calor, sendo denominados também de endotérmicos. A temperatura corpórea dos outros grupos de animais, como os crustáceos, varia de acordo com a temperatura do ambiente em que vivem, sendo classificados como termoconformadores. Esses animais possuem uma baixa taxa metabólica, portanto precisam de fontes externas de calor, como a radiação solar, para aquecer o corpo e dessa forma são chamados de ectotérmicos (Lagerspetz e Vainio, 2006).

Por outro lado, os animais também podem ser classificados com base na estabilidade da temperatura corpórea. Nesse sentido, aves e mamíferos são denominados homeotérmicos, tendo em vista que esses animais mantêm a temperatura corpórea numa faixa de constância. Em contrapartida, os outros grupos de animais apresentam variações térmicas corporais de acordo com as oscilações térmicas do ambiente em que estão inseridos. Dessa forma, os termos: endotérmico e ectotérmico são empregados em relação aos mecanismos fisiológicos que estabelecem a temperatura corpórea. Sob outra

perspectiva os termos: homeotérmico e heterotérmicos fazem menção a capacidade que o animal tem ou não de manter a temperatura em uma faixa de constância. Essa inaptidão de manter a temperatura corpórea numa faixa de constância os torna mais suscetíveis a sofrer maiores impactos das mudanças climáticas (Deutsch *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2012).

Sabe-se que um dos fatores abióticos muito importante para a manutenção da homeostasia é a temperatura (Huey,1982) e que os organismos são termodinamicamente suscetíveis à troca de energia com o meio em que estão inseridos. Diversas pesquisas comprovam que os ecossistemas são influenciados pelo clima (Easterling *et al.*,2000), essa realidade pode ser comprovada pela alteração da composição de muitas comunidades (Wuethrich, 2000). Tem-se documentado a interferência das alterações climáticas nas comunidades marinhas e intermareais contendo tanto espécies de vertebrados (Planque e Frédou,1999; O'brien *et al.* 2000) como de invertebrados (Newell,1973; Southward *et al.*,1995).

As mudanças climáticas podem influenciar na densidade populacional de diversas espécies (Martin, 1998), por exemplo, o sexo de muitas tartarugas é determinado pela temperatura máxima que o embrião foi submetido (Jasen,1994), portanto, extremos de temperatura podem acarretar em problemas para reprodução desses indivíduos. As alterações no clima também podem intervir na maneira como as populações se distribuem geograficamente (Parmesan *et al.*, 1999), no fenótipo (Silbiger e Munguia,2008) e no comportamento desses animais (Lagerspetz e Vainio, 2006). Em suma, os organismos evoluíram dentro de uma faixa de temperatura, e só são capazes de sobreviver dentro dela, pois a temperatura pode interferir nos processos fisiológicos, dificultando a manutenção da homeostasia (Pörtner, 2002).

Os limites térmicos dos animais são determinados pela associação de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, como a suscetibilidade de enzimas e outras proteínas (Somero, 2004), pois a temperatura intervém na velocidade que as reações bioquímicas ocorrem, além de canalizar energia para preservar a homeostasia, (Liu, 2013), na tentativa de evitar danos ao organismo. O limite térmico crítico (TC) foi definido como sendo o ponto térmico em que ocorre a desorganização da atividade locomotora e o indivíduo torna-se incapaz de escapar de situações que irão leva-lo à morte, na natureza, essa

temperatura é letal (Cowles e Bogert 1944). Dentro dessa faixa de temperatura estão as temperaturas críticas mínimas (TC_{\min}) e máximas (TC_{\max}). Essas temperaturas marcam o limite entre as zonas de resistência e as zonas letais (Jobling, 1981) chegando à temperatura letal resultante (TL_{50}), que é a temperatura que mata 50% da população (Huner, *et al.*,1998). A faixa de temperatura que os animais desempenham suas funções eficientemente, mantendo a homeostasia, pode ser considerada (Espina e Vanegas, 2005) como sua preferência térmica.

Levando em consideração que a temperatura do ambiente é capaz de influenciar em diversos processos fisiológicos, como o crescimento, a reprodução e a sobrevivência, foi necessário que muitos animais, mesmo sendo ectotérmicos, desenvolvessem algumas estratégias para alterar em algum grau a temperatura corpórea. Essas estratégias podem ser morfológicas, fisiológicas, ou comportamentais, e podem ocorrer concomitantemente com intuito de deixar a temperatura corpórea em uma faixa de preferência térmica ou ao menos dentro dos limites de temperatura críticas (Cumillaf *et al.*,2016). Nesse sentido, embora o termo termorregulação se refira à manutenção da temperatura através dos processos fisiológicos, e levando em consideração a importância dessas estratégias para sobrevivência desses animais, nessa dissertação a capacidade dos ectotérmicos de controlar em algum grau sua temperatura será denominada “termorregulação”. Assim sendo, a “termorregulação” é um meio eficaz e rápido para lidar com a heterogeneidade do ambiente térmico e seus efeitos são facilmente reversíveis (Angilletta *et al.*,2002). De fato, o comportamento como estratégia de “termorregulação” vem chamando atenção da comunidade científica (Gvoždík, 2011; Sinervo, 2010; Buckley,2007), uma vez que, este é um recurso importante que os animais podem empregar quando estão em situações de estresse térmico.

1.4.1 Aclimação Térmica:

Muitos animais são capazes de ajustar estruturas celulares e moleculares quando submetidos em uma condição ambiental estressante (dentro de certos limites de mudanças ambientais) na tentativa de manterem as suas capacidades de desempenho fisiológico e comportamental próxima da

ideal. Dessa forma até conseguem tolerar situação ainda mais estressantes que antes não conseguiam, isto é, conseguem ampliar sua faixa de tolerância. Esse ajuste é denominado aclimatação ou aclimatização (Prosser, 1991), ou também plasticidade fenotípica. Aclimatação se refere aos ajustes que ocorrem num animal quando submetidos a mudanças ambientais controladas dentro de um laboratório. Nesse caso o pesquisador conhece e controla a intensidade e taxa dessas mudanças. Aclimatização se refere aos ajustes que ocorrem num animal quando submetido a mudanças ambientais na própria natureza. Nesse caso o pesquisador não controla e nem tem conhecimento de todos os tipos, intensidades e taxas de alterações que o ambiente sofreu. O processo de aclimatação/aclimatização vem chamando atenção de diversos pesquisadores, pois essa habilidade permite que os animais se estabeleçam com sucesso em um ambiente (Angilleta 2009), mesmo que este apresente variações de fatores que antes se imaginava acima da sua capacidade de tolerância.

Um bom exemplo a ser citado, é a aclimatação térmica, que pode modificar a tolerância térmica de muitos ectotérmicos (Hopkin *et al.*, 2006). O desempenho de um indivíduo em resposta a hipertermia, pode variar de acordo com a temperatura que o animal foi aclimatado. A aclimatação térmica muitas vezes envolve alteração na expressão de aloenzimas e mudanças de membranas ou do ambiente celular, que podem ser reversíveis ou não (Somero *et al.*, 1996). Portanto, quando os animais sofrem aclimatação térmica, respondem melhor ao estresse térmico, do que os animais que não foram aclimatados (Seebacher *et al.*, 2015). Dessa forma, a resposta de muitos animais frente a um estresse termal é influenciada por inúmeros fatores, como a história térmica de um indivíduo e a temperatura em que foi aclimatado (Berger 2010), assim sendo, a temperatura preferencial dos animais pode ser alterada por essas variáveis (Crawshaw *et al.*, 1992).

Ainda nesse sentido, observou-se que a aclimatação a temperaturas mais elevadas, aumentou a $TC_{máx}$ de caranguejos das espécies *Cancer pagurus* e *Carcinus maenas* (Cusculecu e Hyde 1998). Outro exemplo a ser citado é do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*, que aumenta a tolerância térmica em 5,7°C quando a temperatura de aclimatação aumenta de 20 para 32°C (Gonzáles *et al.*, 2010). Ainda nesse sentido, quando o caranguejo

Hemigrapsus crenulatus foi aclimatado a 24°C aumentou significativamente a $TC_{máx}$ em relação aos animais aclimatados a 12, 16 e 20°C (Cumillaf *et al.*, 2016). Diante do exposto, pode-se esperar que a temperatura de aclimação, além de aumentar a tolerância a altas temperaturas, pode alterar a capacidade dos animais semiterrestres em modular seu comportamento de emersão.

1.4.2. Termorregulação comportamental:

Muitos animais que vivem em ambientes termicamente heterogêneos, são capazes de regular, em algum grau, sua temperatura através do comportamento, rastreando áreas termicamente confortáveis e se esquivando daquelas que não são (Reynolds e Casterlin 1979). Essa estratégia, frequentemente é a primeira linha de defesa contra temperaturas extremas (Woods *et al.*, 2015). A observação do comportamento como forma de controlar de alguma forma a temperatura nos ectotérmicos pode ajudar a compreender mais sobre as respostas fisiológicas e as relações ecológicas entre esses animais (Blouin-Demers e Weatherhead, 2001; Angilleta *et al.*, 2010). Nessa dissertação iremos nos referir a esse artifício como “termorregulação comportamental”. Nesse contexto, muitas espécies de peixes migram para outros ambientes com o intuito de deixar a temperatura corpórea na faixa da ideal para manutenção dos seus processos fisiológicos (Rozin, e Mayer, 1961; Crawshaw, e Hammel, 1971; Bryan *et al.*, 1990; Baird e kruger, 2003; Pépino e Magnan ,2015).

Essa estratégia de evadir de ambientes em que a temperatura está na faixa subótima também é utilizada por muitos grupos de crustáceos, onde a diferença de poucos graus determina escape ou a ocupação de ambiente (Lagerspetz e Vanio 2006), e pode ser modulado pela temperatura que o animal foi aclimatado (Kivivuori, 1994). No ambiente intermareal existem diversos microclimas com condições abióticas diferentes, de modo que se encontra diversas condições térmicas pouco distantes uma da outra. Portanto, animais que vivem nesses ecossistemas são ideais para se avaliar o impacto das mudanças climáticas (Somero, 2002).

Nesse sentido animais semiterrestres, que habitam zonas intertidais, podem utilizar o comportamento de emersão como uma forma de evitar ambientes estressores. De fato, foi observado que o caranguejo *Carcinus maenas*, em estresse térmico, migrou espontaneamente para o ambiente aéreo com intuito de arrefecer sua temperatura corpórea (Taylor e Wheatly 1979). Thurman (1998) verificou que caranguejos de 5 espécies simpátricas do gênero *Uca* são capazes de resfriar o corpo, chegando a uma temperatura abaixo da temperatura ambiental através da evaporação de água armazenada na câmara branquial.

Diante do exposto, a idealização de que o comportamento de emersão atua como uma estratégia de controlar a temperatura é fortalecida. Essa ideia corrobora com a teoria de que, durante a evolução, os caranguejos semiterrestres e terrestres, invadiram o ambiente aéreo com a intenção de migrar para um microhabitat onde a temperatura era mais amena (Bliss 1968, Thurman, 1998).

1.5 O caranguejo *Neohelice granulata*:

O caranguejo *Neohelice granulata* (figura 4) anteriormente chamado *Chamagnatus granulata* (Spivak, 2010), pertence à família Varunidae (Decapoda, Crustacea) e vivem em marismas de estuários, a partir do litoral do Rio de Janeiro, no Brasil até o Golfo de San Martin, na Argentina (Boschi, 1994). São animais semiterrestres, que habitam tocas de profundidades variadas (Halperin *et al.*, 2000), sendo considerados importantes bioturbadores. As alterações no sedimento feitas por esse caranguejo aumentam os níveis de oxigênio e a drenagem do solo (Martinetto *et al.*, 2016). Esse caranguejo executa um papel determinante nas comunidades do seu ambiente, devido ao seu comportamento, sua abundancia e sua ampla distribuição (Botto, e Iribarne, 1999), além disso, a sua dieta onívora/detritívora torna-os importante para a ciclagem de nutrientes nas marismas.



Figura 4. *Neohelice granulata*.

Durante a evolução, os animais desenvolveram respostas adaptativas aos diferentes ambientes, essas podem ser funcionais, estruturais, comportamentais ou uma combinação de todas (Díaz e Rodríguez 1977). A invasão do ambiente aéreo por caranguejos semiterrestres exige uma série de adaptações. Muitos caranguejos anfíbios, como o *N. granulata*, são capazes de armazenar água em sua câmara branquial quando migram para o ambiente terrestre. A água é expelida pela abertura exalante, corre ao longo da carapaça, e volta reoxigenada para câmara branquial através da abertura de Milne-Edwards (Santos *et al.*, 1987) (figura 5), possibilitando trocas gasosas com a água presente câmara branquial quando estão no ambiente aéreo.

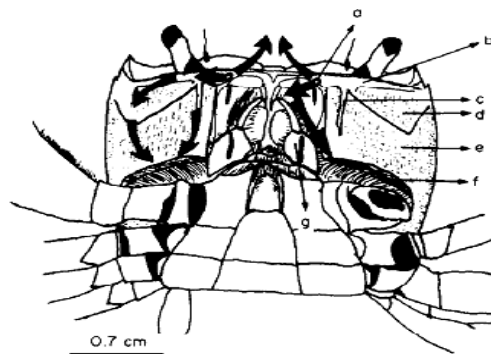


Figura 5. Visão antero-lateral do caranguejo *Neohelice granulata* indicando o processo de recirculação da água através das setas. **a.** abertura exalante, **b.** sulco dorsal; **c.** sulco ventral; **d.** sulco central; **e.** pterigostoma, **f.** abertura Milne-Edward's ; **g.** terceiro maxilípode (Santos *et al.*, 1987).

Além disso, essas espécies de caranguejos são classificadas também como bimodais, pois possuem a capacidade de fazer respiração aquática e respiração aérea. Eles possuem brânquias reduzidas e mais espessas para que não colabem no ambiente aéreo (Halperin *et al.*, 2000). Esses órgãos são responsáveis pela respiração aquática, pela excreção de amônia e CO₂, pela osmorregulação e pelo equilíbrio ácido-básico (Cameron, 1981). Outra adaptação presente nessa espécie e em muitos outros caranguejos semiterrestres é a existência de uma superfície respiratória alternativa, uma estrutura extrabranquial denominada branquiosteguito, ou pulmão branquiostegal, localizada no epitélio da câmara branquial, que permite a obtenção de oxigênio do ambiente aéreo e auxilia no consumo de O₂ (Diaz e Rodriguez, 1977). Portanto, essa estrutura, concomitante a recirculação de água permite que esses caranguejos façam excursões ao ambiente aéreo.

Quando *N. granulata* migra para o ambiente aéreo, ele imediatamente recircula a água pela carapaça, porém essa estratégia para captação de O₂ é mantida por no máximo 5 h (Santos *et al.*, 1987). O caranguejo *N. granulata* é capaz de sobreviver até 17 horas de emersão forçada, e o tempo letal para 50% da população ocorre em 39,4 horas nessa situação (Schmitt e Santos, 1993). Entretanto, em condições normais (normóxia, 20°C) esse animal permanece em média apenas 3,9 ± 2,2 min cada vez que vai para o ambiente aéreo. Por outro lado, em condições de hipóxia severa, *N. granulata* se mantém por mais tempo no ambiente aéreo, permanecendo em média 13,9 ± 3,9 min (Lima *et al.*, 2015). Esse episódio corrobora com a ideia de que o comportamento de emersão é um recurso que esses animais podem usar para evitar condições estressoras no ambiente aquático.

Embora o comportamento de emersão seja uma boa estratégia, que pode ser empregada por caranguejos semiterrestres para evitar situações estressoras na água, como hipoxia e estresse térmico, por exemplo, esses animais não estão fisiologicamente aptos a passar longos períodos no ambiente aéreo. A exposição aérea pode acarretar no acúmulo de CO₂ na hemolinfa, levando a um quadro de acidose, além de que os animais não são capazes de eliminar amônia no ambiente aéreo (Wood and Randall, 1981; Luquet *et al.*, 1998). Esses fatos devem impulsionar que os animais migrem

para o ambiente aquático, para eliminar o CO₂ e amônia armazenados. Outro problema que os animais enfrentam quando estão no ambiente terrestre, é a suscetibilidade a predação e a perda de água para o meio (Luppi, 2013). Esses fatores devem limitar o tempo que os caranguejos permanecem fora d'água.

Diante do exposto, sabendo que o caranguejo *Neohelice granulata*, é um animal extremamente significativo no ecossistema estuarino, devido a sua importância ecológica nessa região, e que esse animal está exposto a flutuações de temperatura no ambiente em que vive e levando consideração que esse animal possui diversas características, anatômicas e fisiológicas, semelhantes a outros caranguejos semiterrestres estuarinos, como a capacidade de aclimatar-se a diversas situações. Essa dissertação visou avaliar a importância do comportamento de emersão de *N. granulata* em situação de estresse térmico e o efeito da aclimação térmica sobre esse processo.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo geral:

Verificar se o aumento da temperatura altera o comportamento de emersão do caranguejo *Neohelice granulata*.

2.2 Objetivos específicos:

- Verificar se a tolerância e resistência a altas temperaturas são aumentadas pelo comportamento de emersão e pela aclimação térmica;
- Verificar se a frequência e duração do comportamento de emersão do caranguejo *N. granulata* são alteradas em função do aumento da temperatura e da temperatura de aclimação;

3. Manuscrito

HIGH TEMPERATURE ACCLIMATION CHANGES THE CRAB *Neohelice granulata* EMERSION BEHAVIOR

Manuscrito a ser submetido para a revista Physiology & Behavior

Fator de impacto: 2,34

HIGH TEMPERATURE ACCLIMATION CHANGES THE CRAB *Neohelice granulata* EMERSION BEHAVIOR

Lamia Marques Halal, Bruna Soares Ayres, Tábata Martins de Lima, Fabio Everton Maciel, Luiz Eduardo Maia Nery*

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. Luiz Eduardo Maia Nery. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Av. Itália Km 8, CEP 96201-900, Rio Grande, RS - Brazil.

E-mail address: famnery@terra.com.br Tel.: 55 53 32935194

Abstract:

Temperature can cause many deleterious effects on organisms. We evaluated how the emergence behavior of the semiterrestre crab *Neohelice granulata* is important for these animals under thermal stress. For this, we evaluated the TL_{50} by means of mortality curves, in animals acclimated at 20°C and 30°C with and without possibility of emersion for fresh or hot air. In addition, we observed the behavior of acclimated crabs at 20°C and 30°C, which had the possibility to emerge in an environment where the temperature could be much lower, or near the water temperature, for the period of 3600 seconds. There was 100% mortality at 35°C in submerged animals, acclimated at 20°C and 37°C in submerged animals, acclimated at 30°C. In this way, the acclimation temperature was able to increase the upper thermal limit. When animals acclimated at 20°C were able to emerge, the temperature that killed 100% of the animals increased to 38°C. Also in this sense, the synergistic effect of the acclimation temperature, with the possibility of leaving the hot water, further increased the resistance of these animals to thermal stress, under these conditions 100% mortality occurred at 39°C. In the analysis of behavior, we observed that unlike what occurs under normal conditions, when the crab is subjected to thermal stress conditions, prefers to spend more time in the aerial environment, independent of the temperature of acclimation and of the air. In this situation, it makes small incursions to the aquatic environment, staying longer time in the aerial environment, to cool their body temperature. Animals acclimated at 20°C placed to water at 35°C remained aerial zone, independent of the temperature the air was in. Animals acclimated at 30°C maintained in 30°C (control) and those placed in the water at 35°C with the possibility of emerging into the hot air transited more between the water and the aerial zone, and transited more between the aquatic zone and the aerial zone than animals that were found in the water 35°C with the possibility of emerging in a fresh air environment. Thus, acclimation and emergence behavior made the crabs more tolerant of thermal stress, and when these resources were employed at the same time, the animals became even more tolerant to this environmental situation.

Key words: Crustacean; Thermal limit; Thermotolerance; Thermoregulation; Air Exposure

1. Introduction:

An important concern of the scientific community has been with the increase of the temperature of the planet due climate changes intensification [1]. Body temperature is one of the ecophysiological variables that most affects the physiological activities in ectotherms [2]. Its thermal limits are determined by the association of morphological, physiological and biochemical characteristics, such as the sensitivity of enzymes and other proteins [3]. Therefore, elevated temperatures may cause deleterious effects on various physiological processes, including growth, reproduction and survival of these animals [4]. Thus, during the evolutionary process, it was necessary for the animals to develop molecular, physiological or behavioral responses to support temperature fluctuations [5].

The organisms that live in thermally heterogeneous environments are able to regulate, to some degree, its temperature through behavior, tracking thermally comfortable areas and dodging those that are not [6]. This strategy is often the first line of defense against extreme temperatures [7]. The intertidal zones present several microclimates with different abiotic conditions, so that several thermal conditions are found with a little distance from each other [8]. This fact reflects the thermal adaptation and evolution in the phenotypic plasticity of the individuals that live in this ecosystem [9]. Semiterrestrial animals, such as crabs, that inhabit these environments can leave the water and migrate to the air environment in order to cool their body temperature. For example, when the crab *Carcinus maenas* under thermal stress migrated spontaneously to cool air environment, it served to lower its body temperature [10]. Also in this sense, studies have confirmed that crabs of 5 sympatric species of the genus *Uca* are able to cool the body, reaching a temperature below ambient temperature by evaporating water stored in the branchial chamber [11].

Although the emergence behavior is a great resource that animals can use, the period in which such animals are expected to remain in the air environment is limited. When they are out of water, crabs are more exposed to predation and dehydration [12]. Another fact that limits the period of emersion,

is that these animals are not able to eliminate CO₂ and ammonia efficiently in the aerial environment [13;14], which should lead the crabs back into the water.

Thermal response involves expression of allozymes, membrane changes which may be reversible or not [15]. Many animals suffer less intensely to a temperature change when they have the opportunity to acclimate to this environmental variable [16]. Therefore, the performance of an individual in response to hyperthermia may vary according to their thermal history and the temperature at which they were acclimated [17]. So, the preferred temperature, thermal limits and the emergence behavior of the animals can be altered by acclimation [18]. In this sense, studies demonstrate that acclimation increased the maximum critical temperature of two species of crabs (*Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*) [19]. However, few studies have been done, to verify whether the temperature, at which the animal was acclimated, will influence the emergence behavior.

The semiterrestrial crab *Neohelice granulata* belongs to the family Varunidae (Decapoda, Crustacea), inhabits several depths in the marshes of estuaries and salt marshes, from the coast of Rio de Janeiro in Brazil to the Gulf of San Martin in Argentina (Boschi, 1994). This crab is exposed to daily and seasonal temperature variations and this animal may remain for some time in the air, recirculating water from the gill chamber on the carapace. They are also capable of capturing O₂ from the air environment through the branquiosteguite [14; 20]. Research has shown that this crab increases its frequency of exposure to air and the time spent in the air when exposed to severe hypoxia [21].

The objective of this study was initially to investigate whether the semi-terrestrial estuarine crabs, such as *Neohelice granulata*, use emersion behavior as a resource to avoid thermal stress and thus increasing its tolerance and resistance against high temperatures. After this, we investigated if this behavior is modulated by exposition to high temperature and by the process of thermal acclimation.

2. Methodology

2.1 Animal maintenance:

Male adult crabs were collected manually, all year long in the salt marshes of the Laguna dos Patos estuary, in Rio Grande (Rio Grande do Sul - Brazil). These animals were kept, for at least 10 days, in tanks with free access to the air, at the Biological Sciences Institute of the Federal University of Rio Grande (FURG) under constant conditions: 20°C, 20‰, 12L:12D photoperiod and were fed *ad libitum* with ground beef 3 times in the week up to 24 hours before the experiment. After this period, the crabs were immersed in a 10 litres aquarium, with constant aeration, for at least a week before the beginning of the experiments, in which the animals were divided into 2 groups, one group was maintained at the same initial water temperature (20°C) and the other was kept at 30°C. The temperature was controlled by thermostat (Fullgauge, Acquaterm/08-TIC-17).

2.2. Tolerance and resistance test to high temperatures:

To estimate the lethal temperature for 50% of the population (LT_{50}) and the resistance of the animals, we used groups of 10 crabs acclimated at 20°C and groups of 10 crabs acclimated at 30°C. Some groups, from both acclimation, were kept submerged in aquariums without access to air throughout the experimental period. The animals from these groups were kept submerged in aquariums with 10 liters of water, constantly aerated. The animals acclimated at 20°C were submitted to different water temperatures, the control was kept at 20°C, and the experimental groups were tested at 33°C; 34°C; 35°C and 36°C. The animals acclimated at 30°C were submitted to 30°C (control) and experimental groups were tested at 34°C; 35°C; 36°C and 37°C. Each group of animals was submitted to a single temperature. The experiments were in triplicate, mortality and temperature were monitored every 2 hours for 96 hours (Table 1).

The others groups of animals were placed in aquariums divided into 2 environments: aquatic and aerial. Crabs were able to move freely between these environments and access either the aerial environment where the

temperature was either near to water temperature (hot air) or the temperature close to $26 \pm 2^\circ\text{C}$ (fresh air). Groups of animals previously acclimated at 20°C were exposed to water at 35°C , 37°C and 38°C . The animals acclimated at 30°C were placed in aquariums where the water temperature was at 35°C , 39°C and 40°C . All experiments were done in triplicate and each group was submitted to a single experimental condition until the end of the 96 hour experiment, and mortality and temperature were monitored every 2 h (Table 1).

Acclimation temperature	Submerged	Free exhibited	
		Fresh air	Hot air
20°C	33°C	37°C	35°C
	34°C		
	35°C	38°C	
	36°C		
30°C	34°C	39°C	35°C
	35°C		
	36°C	40°C	
	37°C		

Table 1: Water temperature that animals acclimated at 20°C and 30°C were submitted for the tolerance test and resistance for 96 hours.

2.3. Behavior of emersion in response to high temperatures:

For behavior analysis, 3 groups were used with 5 crabs acclimated at 20°C and other 3 groups with 5 crabs acclimated at 30°C , each group was submitted to only one experimental condition. The animals were recorded (SONY SSC-G118) for 3600 seconds and the animals were monitored in three zones: water (animal completely submerged); intermediate (when the carapace was in contact with both environments) and aerial (animal completely emerged). The control group of the acclimated animals at 20°C were submitted to water 20°C with to the aerial zone at 20°C , while the control group of the acclimated animals at 30°C were submitted to water 30°C with access to the air at $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Groups of animals acclimated at 20°C and groups of animals acclimated at

30°C were submitted also to water at 35°C with access to fresh air ($20 \pm 3^\circ\text{C}$) and to the hot air environment ($35 \pm 2^\circ\text{C}$). The water was constantly aerated and the experiments were done in triplicate.

The total time the animals stayed in each environment was quantified by SMART[®] version 3.0 software. The videos were analyzed to determine the period the crabs remained out of the water at each emersion and the number of emersions. We calculated the frequency of locomotion of the crabs by evaluating how long they kept moving in the aerial environment for 30 seconds every 10 minutes totaling 90 seconds of observation for this estimate.

2.4. Statistical analysis:

The results obtained in the tolerance and resistance experiment were adjusted in a non-linear regression using the program GraphPad Prism 5.00, and the survival curves of acclimated animals at 20°C and 30°C were differentiated by two-way analysis of variance. The results obtained in the behavior experiments were treated by one-way analysis of variance, followed by the Dunns post hoc test ($\alpha = 0.05$).

3. Results:

3.1. Tolerance and resistance to thermal stress:

There was no mortality of the animals acclimated at 20°C and submerged at 33°C, demonstrating that the animals tolerate this temperature. There was only $23.3 \pm 2.8\%$ mortality in animals submersed at 34°C after 96h of experiment. The animals submerged at 35 and 36°C presented 100% mortality in 58 and 12 h, respectively. The LT_{50} estimate was 34.3°C (CI-33.2-35.4) (Fig.1). The possibility of leaving the water increased the thermotolerance of these crab. When those animals were placed in 35°C with the possibility of emerging in a hot air the mortality rate dropped to $70 \pm 9.5\%$. The aeral temperature also influenced the tolerance of the animals at high temperature. When the air remained at temperature much lower than the water, the animals were able to tolerate when they were placed in the water at 37°C. When we

increased the temperature of the water to 38°C, the animals stopped tolerating and resisted for a short time, thus, there was 100% mortality in this experimental condition (Fig. 2A).

There was no mortality of the animals acclimated at 30°C and submerged at 34°C, however in the submerged animals at 35°C, 36°C e 37°C, mortality was $36.6 \pm 4.6\%$, $66.6 \pm 4.8\%$ and 100%, respectively. The LT_{50} estimate was 35.45 (CI-35.26-35.74) (Fig. 1). Mortality curves from crabs acclimated at 20 and 30°C were significantly ($p < 0.05$) different demonstrating that acclimation at 30°C increases the thermotolerance of *N. granulata* at high temperatures. These animals are capable to tolerate without mortality when placed in water at 35°C with the possibility of exiting into the hot air. The thermotolerance increases considerably when the air temperature is much lower than the water temperature. There was no mortality when the animals were placed in the water at 37°C and 39°C with the possibility of emerging in the fresh air. However, when they were placed in the water at 40°C with the possibility of emersion into fresh air, the animals lost the ability to tolerate thermal stress, and 100% of the animals died in this experimental condition.

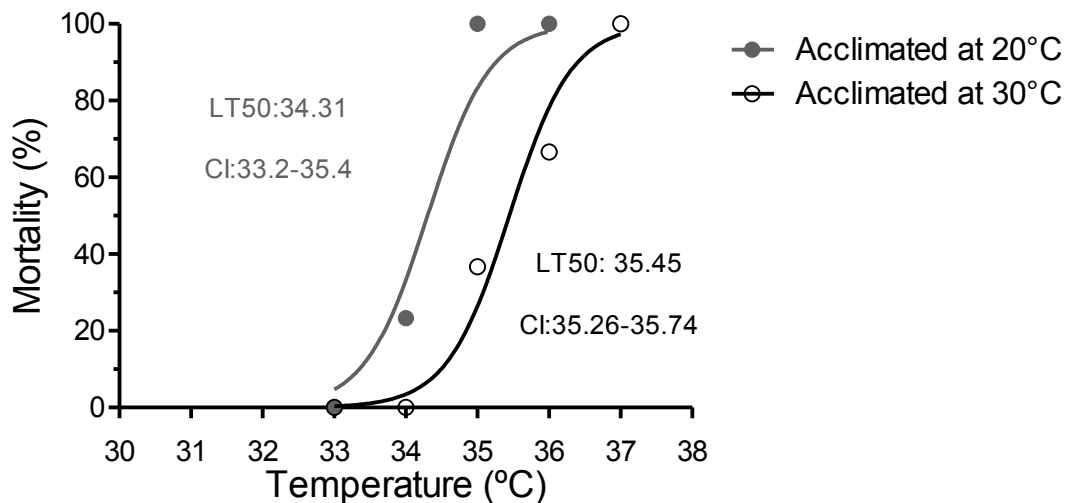


Fig. 1 Upper thermal limit of *N. granulata*, acclimated at 20°C (● - $R^2 = 0.9529$) and at 30°C (○ - $R^2 = 0.9213$).

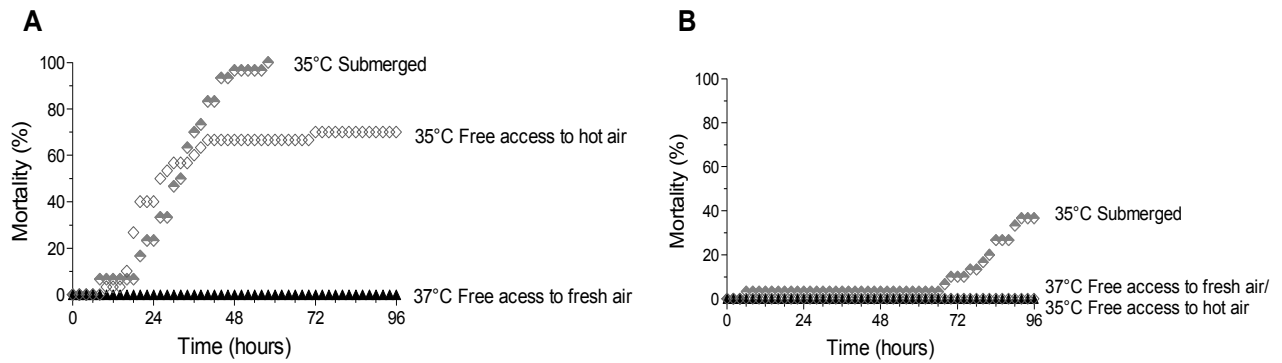


Fig. 2 Mortality of *N. granulata*, acclimated at 20°C (A) and 30°C (B), exposed to high temperature in submerged groups or with the possibility of emersion in hot or fresh air. Animals acclimated at 20°C: submerged at 35°C (◆); submitted to water 35°C with the possibility of emerging into the hot air (35 ± 3°C) (◇), submitted to water 37°C with the possibility of emerging into fresh air (26 ± 2°C) (▲). Animals acclimated at 30°C: submerged at 35°C (◆); submitted to 35°C water, with the possibility of emerge in to hot air (35 ± 3°C) (◇); submitted to water 37°C with the possibility of emerging in fresh air (26±2°C) (▲).

3.2 Emersion behavior in response to high temperatures:

3.2.1. Animals acclimated at 20°C:

By observing the behavioral profile of the acclimated crabs at 20°C, we verified that the animals in the control group remained longer time in the water (2471.5 ± 205.6 s) than in the intermediate zone (212.7 ± 28.0 s) and in the aerial zone (915.7 ± 210.9 s) ($p < 0.05$). There was no significant difference ($p > 0.05$) between the time the crabs were in the aerial and intermediate zone. The period that the animals placed in the water at 35°C with hot air remained in the water (133.4 ± 39.9 s) was significantly ($p < 0.05$) lower than in the intermediate zone (1129.1 ± 221.7 s). The period that the animals remained in the aerial zone (2337.3 ± 239.7 s) was significantly higher ($p < 0.05$) than the period that the crabs remained in the other two zones. Crabs placed in the water at 35°C with the possibility of emerging into fresh air remained significantly ($p < 0.05$) longer time in the aerial zone (2468.9 ± 223.0 s) than in the aquatic zone (142.5 ± 40.4 s) and in the intermediate zone (988.5 ± 196.1s).

There was no significant difference ($p > 0.05$) in the period they passed in these areas (Fig. 3A).

The animals submitted to water at 35°C remained significantly ($p < 0.05$) more time in the aerial environment at each emersion than the control animals. The temperature of the air, fresh or hot, did not cause significant difference ($p > 0.05$) (Fig.3B) in time of each emersion. Control animals exited to the air significantly ($p < 0.05$) more than the animals that were placed in water at 35°C, regardless of the air temperature (Fig.3C).

3.2.2 Animals acclimated at 30°C:

Control animals acclimated at 30°C remained significantly ($p < 0.05$) longer time in the aerial zone (2613.3 ± 193.1 s) than in the aquatic zone (682.0 ± 176.5 s) and intermediate zone (247.5 ± 64.3 s). There was no difference in the time that the animals remained in these last two environments ($p > 0.05$). The animals placed in the water at 35°C with hot air remained significantly ($p < 0.05$) more time in the aerial zone (2807.5 ± 174.6 s) than in the aquatic zone (446.2 ± 126.3 s) and in the intermediate zone (13466.1 ± 143.2 s). There was no difference in the time that the animals remained in these last two environments ($p > 0.05$). The animals placed in the water at 35°C with the possibility of emerging into the fresh air remained significantly ($p < 0.05$) more time in the air environment (3094.3 ± 189.7 s) than in the aquatic zone (58.0 ± 28.1 s) and in the intermediate zone (451.4 ± 176.4 s). There was no significant difference ($p > 0.05$) in the period that the animals remained in these last two zones. The period that animals placed in water at 35°C with the possibility of emerging in the hot or fresh air environment, remained in the aerial zone did not differ significantly ($p > 0.05$) in the time of use of each environment (Fig. 4A) among themselves and neither of the control. Control animals and animals placed in 35°C water with the possibility of emerging in the hot air environment move significantly ($p < 0.05$) more to water than animals subjected to water at 35°C with the possibility of migrating to fresh air (Fig.4B). The animals placed in water at 35°C with the possibility of emersion in the fresh air environment remained significantly ($p < 0.05$) well longer in the aerial zone at each emersion than the

control animals and than the animals subjected to water at 35°C with the possibility of emerging into the hot air environment (Fig. 4C).

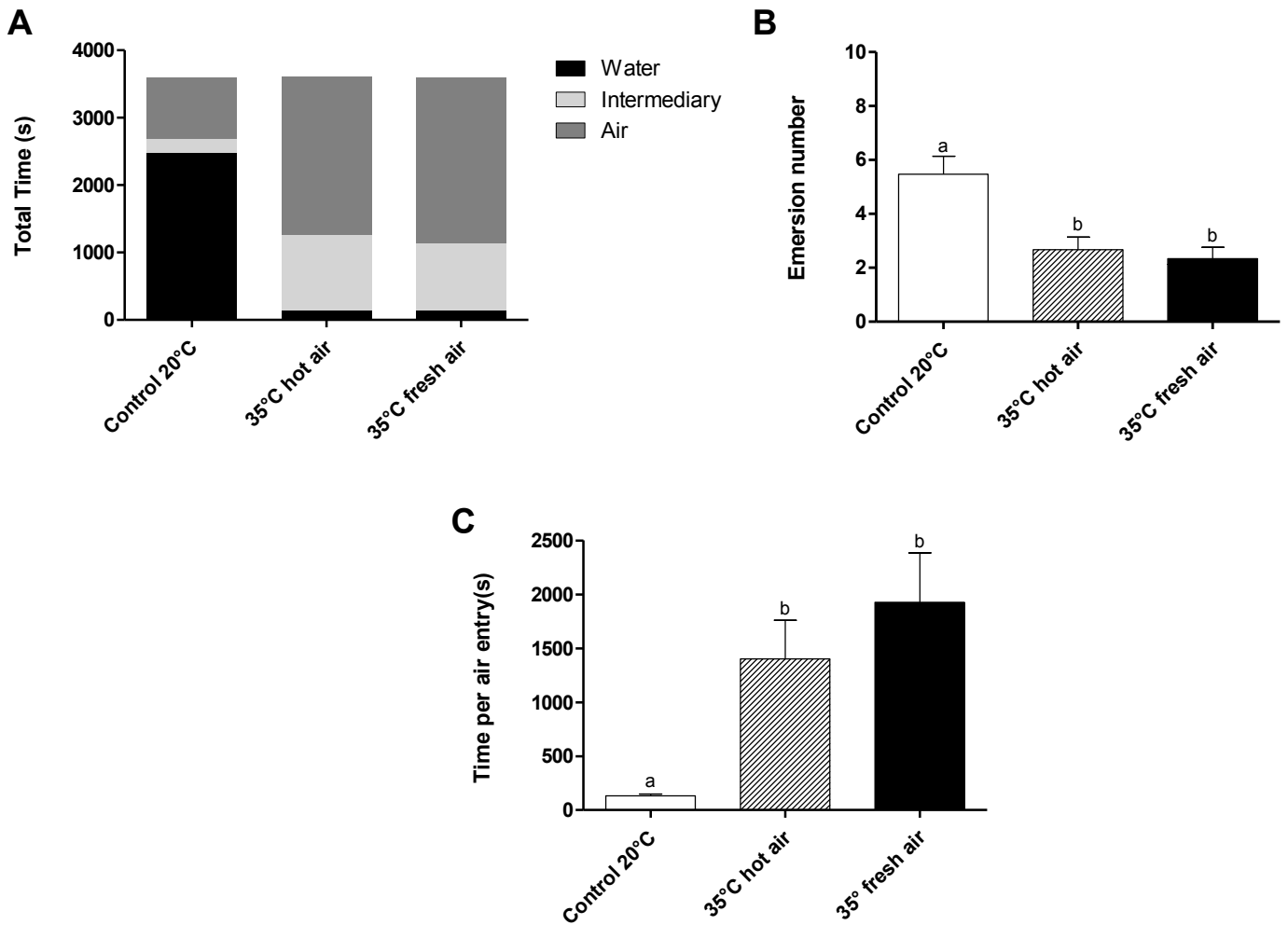


Fig 3. Emersion behavior profile of *N. granulata*, acclimated at 20°C, exposed to different temperatures. Total time in each environment (A), number of emersion (B) and permanence time in air at each emersion (C), during 3600 seconds of experiment. Data are represented by means \pm standard error. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$) between the groups. The white columns represent control, the columns with diagonal lines represent animals subjected to water at 35°C and hot air, black columns represent animals subjected to water at 35°C and fresh air.

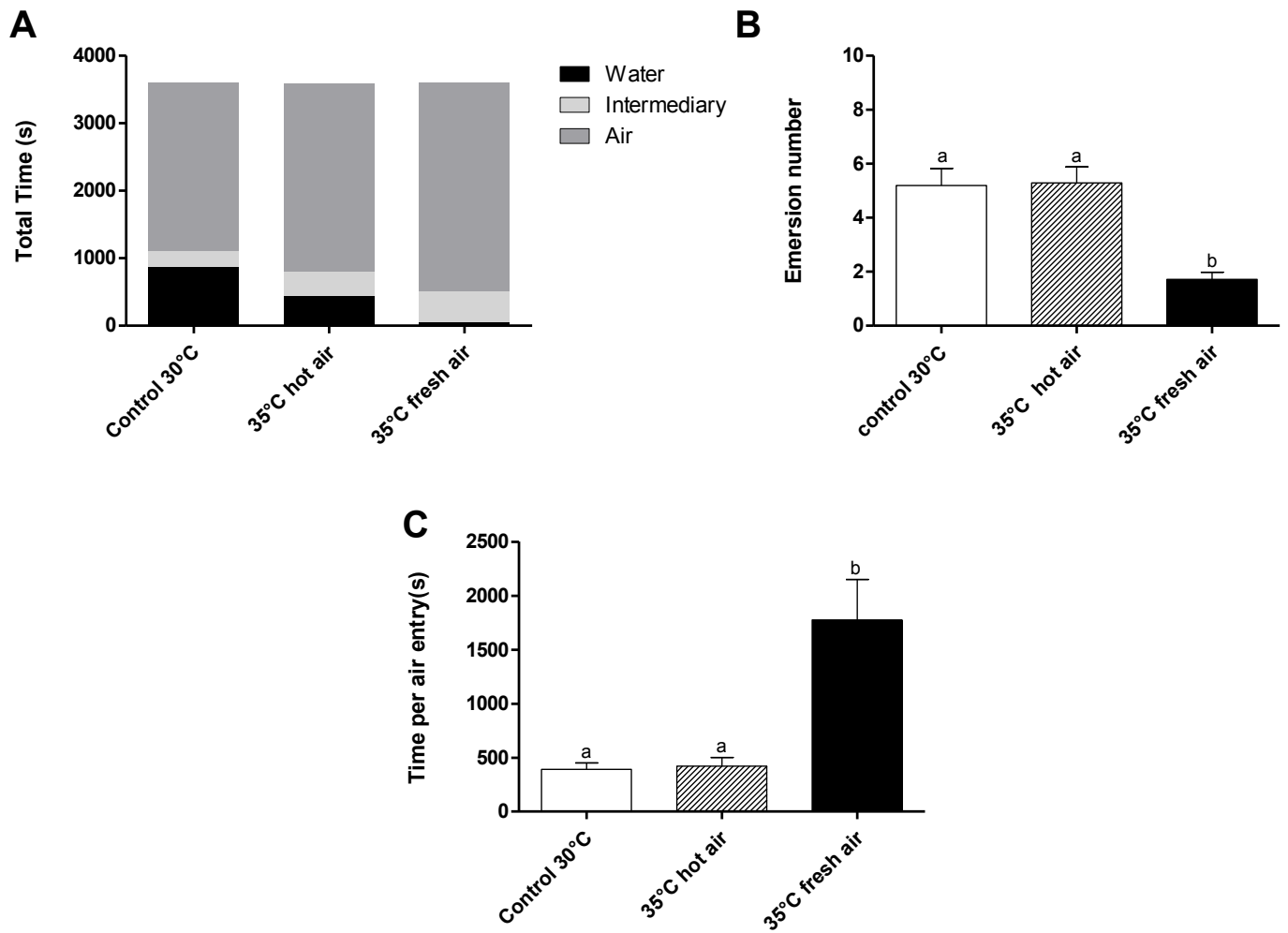


Fig 4. Emersion behavior profile of *N. granulata*, acclimated at 30°C, exposed to different temperatures. Total time in each environment (A), number of emersion (B) and permanence time in air at each emersion (C), during 3600 seconds of experiment. Data are represented by means \pm standard error. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$) between the groups. The white columns represent control, the columns with diagonal lines represent animals subjected to water at 35°C and hot air, black columns represent animals subjected to water at 35°C and fresh air.

3.2.3 Comparison between animals acclimated at 20°C and 30°C:

When we compared the results of acclimated crabs at 20°C and 30°C, we observed that the animals acclimated at 20°C of the control group remained significantly ($p < 0.05$) less time in the aerial environment than the animals of the other groups. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the period between the animals of the control group 30°C and the animals submitted to water 35°C, of both acclimations, with the possibility of emerging into the hot air remained in the air environment (Fig 5). The animals in the control group 30°C and the animals acclimated at 30°C and submitted to water at 35°C with the possibility of emerging into the hot air did not differ significantly ($p > 0.05$) from control 20°C animals in the number of water exit (Fig. 6A).

The animals in the control group 20°C remained significantly ($p < 0.05$) less time at each incursion into the air environment than animals acclimated at 20°C submitted to 35°C in the water, with the possibility of emerging into the hot air and than the animals acclimated at 30°C. The animals acclimated at 20°C submitted to water at 35°C with the possibility of emerging into the hot air, remained significantly ($p < 0.05$) longer time than each emersion than the control 20°C animals, than the control 30°C animals and than the animals acclimated at 30°C submitted to water at 35°C with the possibility of emerging into the hot air. There was no significant difference ($p > 0.05$) in the period that the animals acclimated at 30°C remained in the air environment at each emersion (Fig 6B).

We observed that the frequency of control crabs 20°C walked in the air environment was significantly ($p < 0.05$) larger than the crabs of the other experimental groups. Animals of the control 30°C walked significantly ($p < 0.05$) more time in the air environment than animals subjected to water at 35°C, with the possibility of emersion in the hot air environment, independent of the acclimation temperature (fig 7).

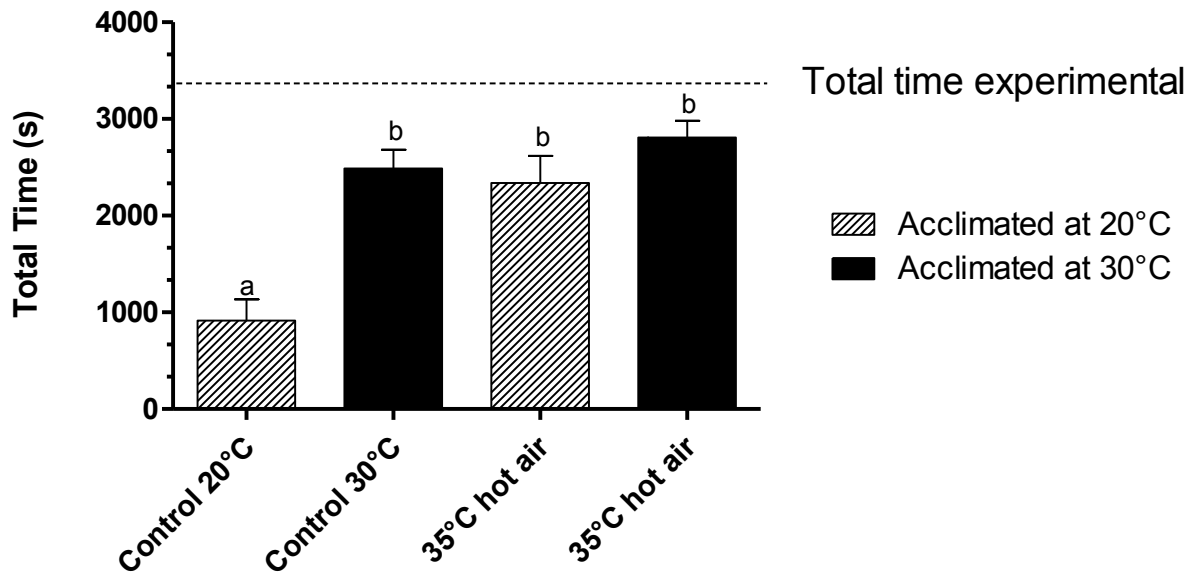


Fig 5. Total time that *N. granulata*, acclimated at 20°C and 30°C, remained in the air for 3600 seconds of experiment. Data are represented by means \pm standard error. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$) between groups. The columns with diagonal stripes represent animals acclimated at 20°C and the black columns represent animals acclimated at 30°C.

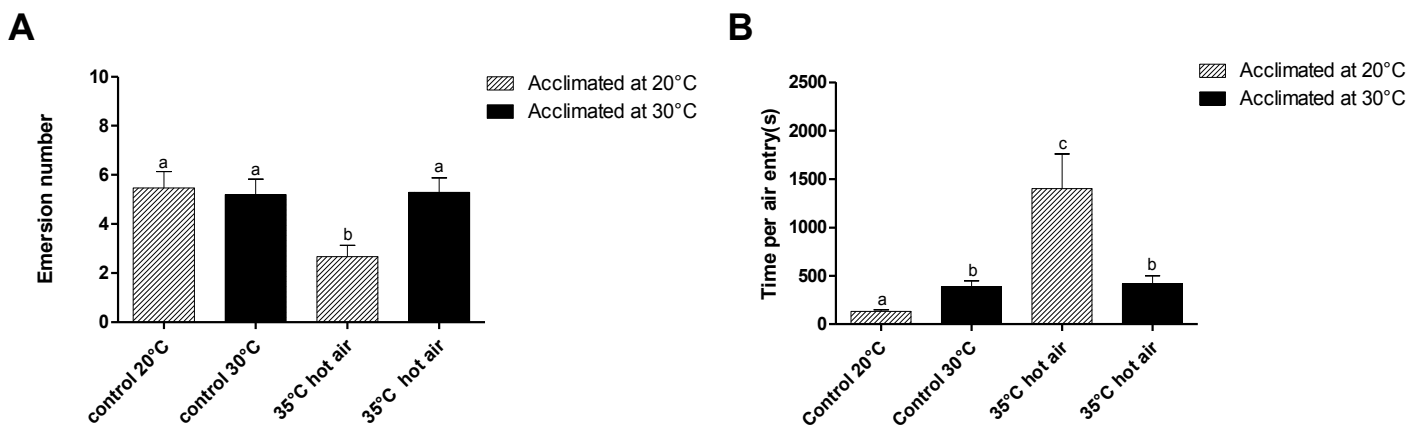


Fig 6. Number of emersions of *N. granulata*, acclimated at 20°C and 30°C (A), and the period that the crabs remained in the air environment at each emersion (B). Data are represented by mean \pm standard error. Different letters represent difference between groups ($p < 0.05$). Columns with diagonal stripes represent the animals acclimated at 20°C and black columns represent animals acclimated at 30°C.

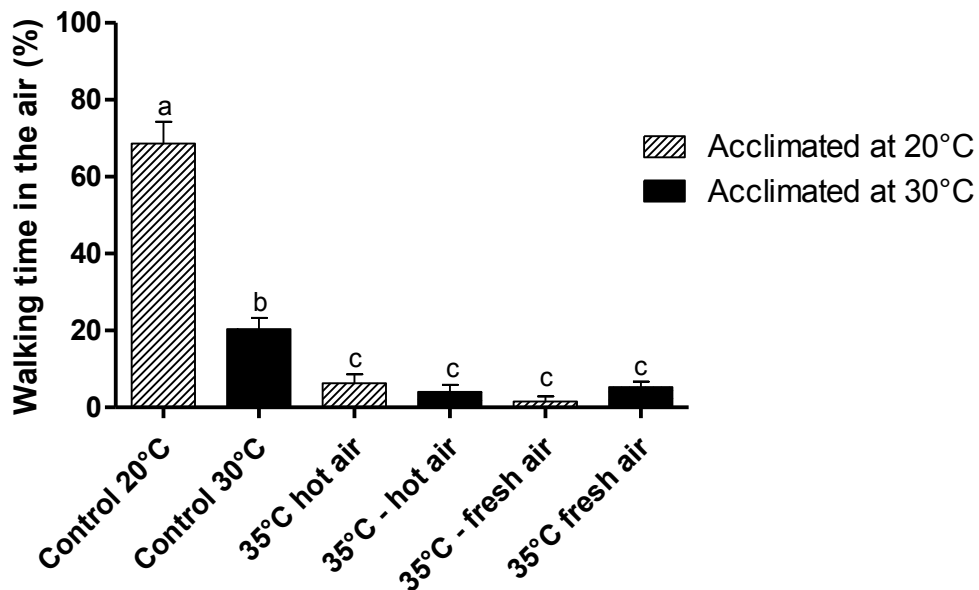


Fig. 7 Frequency of locomotion of *N. granulata* in the air when exposed to high temperatures. Data are represented by mean \pm standard error. Different letters represent significant difference ($p < 0.05$) between the groups. Columns with diagonal stripes represent acclimated animals at 20°C and black columns represent animals acclimated at 30°C.

4. Discussion:

In this work, we observed a homogeneous response of the *N. granulata* crab, acclimated at 20°C, to the increase of temperature. In a small thermal amplitude, from 34°C to 35°C, animals lose their ability to tolerate and already present 100% mortality, demonstrating that temperature is an important and extremely selective environmental factor for this species. Similar result was found in previous studies with *N. granulata* [22]. The temperature of the water in the environment where they live in the estuary of Lagoa do Patos is extremely variable. It oscillates usually from 16 to 29°C in spring summer months, but at some times the temperature of the water may exceed 30°C [23;24]. Our results corroborate the idea that the animals that live in the intertidal zone usually live close to their thermotolerance limits [25;26]. This situation is extremely worrying for this biota. As heat waves are increasingly frequent and more lasting in last years [27], these animals could be more susceptible to these temperature

variations. On the other hand, the ability to acclimatize to the different abiotic conditions can make them more resilient. In this sense they may be settle in habitats where they have to face extreme environmental conditions. Thermal acclimation increasing the thermal limits of many ectotherms [28] usually involves alteration of membrane fluidity, allozyme expression, increased HSP70 expression, altered cuticle structure and increased vascularization [2;29]. In fact, when acclimatizing *N. granulata* at 30°C, we observed that LT₅₀ increased significantly (Fig. 1). Several studies have shown that thermal acclimation has also increased the tolerance and resistance to thermal stress of some species of crabs, crayfish, shrimp, fish, among others ectothermic [30;31;32;33;34].

Another feature used by many animals which makes them more resilient to thermal stress is behavioral thermoregulation. Animals evade environments that offer thermal stress, migrating to microhabitats with less unpleasant temperatures. The crab *N. granulata* is a semiterrestrial crab and is therefore able to spend periods in the aerial environment and can use this resource for a limited period, to evade environments that cause some discomfort. Although *N. granulata* is able to move to the aerial environment, this crab is not completely adapted to stay out of the aquatic environment for a long period [20;35]. After some time in the air, O₂ uptake becomes less efficient. In addition, the excretion of nitrogen products occurs only in water [14] (Luquet et al., 1998). Besides that, another problem that crabs face in the terrestrial environment is that they are more vulnerable to predation and cannibalism [36;12].

Currently there are few studies that analyze how the behavior of emersion can be in fact important to increase the thermosensitivity to high temperatures in the animals which live in the intertidal zone. In our study we observed that the possibility of emerging into the hot air, leads to a small increase in the tolerance of *N. granulata* when acclimated at 20°C. However, when the crab was able to migrate into fresh air, there was a greater increase in their tolerance (fig 2A). Certainly, in the fresh air environment, the loss of body heat is more efficient than in a hot air environment, allowing the maintenance of the physiological processes. The emersion should make the animals more resistant because while the crab is in the aerial environment it evaporates water

through the carapace, cooling the body temperature, as has been shown in previous studies [11;37].

In our results, we obtained 100% mortality when the animals acclimated at 20°C were kept submerged at 35°C. However, when the animals were acclimated at 30°C the mortality rate dropped to 23.3% at 35°C (Fig. 1). In addition, animals acclimated at 30°C are able to tolerate, without mortality, when subjected to 39°C with the possibility of emerging into fresh air and tolerating, without mortality, when they can emerge from the water at 35°C into hot air. Thus, we can consider that the synergistic effect of behavioral thermoregulation and acclimatization at a higher temperature (30°C) further increase the tolerance and resistance of these crabs to face heat waves.

When animals are subjected to such a high temperature that reaches the critical thermal limits, they probably lose the ability to control their movements, and consequently are unable to avoid situations that will lead them to death [38]. In our study, there was 100% mortality, in animals acclimated at 20°C, only in groups of crabs that could emerge into the fresh air when they were placed in water at 38°C. In animals acclimated at 30°C, this situation occurred only in water at 40°C. These temperatures were probably sufficiently high to reach the critical thermal limit of the animals. Thus, the animals lost their ability to control their movements and were unable to get out of the water.

When the crabs were exposed to water and air at 20°C, they had a behavior of frequently move between the aquatic and aerial environment, but remained considerably longer time in the aquatic environment. This behavior was also observed for this species in a previous study [21]. When animals acclimated at 20°C were exposed to water where the temperature was highest (35°C), the crabs remained longer in the air independent of air temperature (Fig. 3A). Thus, as these animals stayed longer in the aerial zone, these animals emerged less frequently than the control animals (3B and C).

This pattern of behavior is different from the behavior adopted by *Procambarus clarkii* [39] that also uses emersion as a form of thermoregulation. These animals increase the number of aerial incursions with increasing temperature. Although the emergence behavior of crayfish has a different profile

of the behavior of *N. granulata*, it is presumably that this crab uses this behavior with the same goal, as *P. clarkii*, to cool the body temperature through the water evaporation. Several fish living in the intertidal zone apparently also use this strategy of leaving aquatic environment to cool the body temperature. They are capable of making small incursions into the aerial environment when the temperature increase [40;41]

In behavioral experiments with animals acclimated at 30°C, we observed that these animals remained predominantly in the aerial environment (Fig 4A). However, when the air temperature was closer to that of the water, the crabs moved more between water and air in relation to the animals exposed to water 35°C and fresh air (fig. 4B; 4C). Probably, the animals that were in the fresh air took advantage of the aerial environment to cooler more efficiently its body temperature than crabs exposed to hot air. Crabs with higher metabolism produce more metabolites, which are more easily excreted in water [20;42], so the animals had to go to the aquatic area more often. This response is similar to that seen in the crab *Hemigrapsus nudus*, where the acclimation to high temperature increased the tolerance of these animals, but did not increase the temperature range capable of causing crabs to escape at high temperatures [43].

The acclimation temperature can also modulate behavioral thermoregulation. When the *Kryptolebias marmoratus* fish and the *Astacus astacus* crayfish were acclimated to a higher temperature, they responded with the emersion behavior to a more intense thermal stress than the animals that were acclimated to a lower temperature [44; 45]. Our objective was to verify how *N. granulata* responds to an acute thermal stress. In this way, both animals previously acclimated at 20°C and to 30°C were under intense thermal stress, and both groups exposed higher water temperature (35°C) resulted in the complete emergence of the crabs.

Previous studies have shown that the acclimation temperature changes the thermal limits, and even the thermal preference of several animals [6]. In our results, however, we observed that when *N. granulata* acclimated at 30°C was able to leave the water, which was at the same temperature at which it was acclimated, it remained longer time in the aerial than in the aquatic zone (fig 4A

and 5), demonstrating that this temperature is not ideal for maintenance of homeostasis.

All animals acclimated at 20°C died when kept submerged at 35°C, and there was also mortality when the animals, with the possibility of migrating into the hot air, were submitted to water at 35°C. This result indicates that this crab is not able to tolerate this situation. Thus, despite the possible evaporation of water and the difficulty of releasing CO₂ and ammonia in the air environment, the animals avoid to the maximum the incursions to the aquatic zone, independent of the temperature of the air. Animals acclimated at 30°C and maintained at all time submerged at 35°C have a low mortality rate, and there was no mortality of crabs, with the possibility of migrating to air, exposed to this water temperature, regardless of air temperature. Therefore, although the air environment was preferred, when the animals had access to hot air, they stayed less time in the air zone at each emersion, and migrated more often to the aquatic zone, supposedly to avoid dehydration, to collect more water to store in the branchial chamber and release their excreta. Then, we can conclude that when the animals are under thermal stress, they increase the number of exits of the water increasing the time of permanence in the air environment, but they do not avoid the aquatic environment. However, when the animals are in a more intense thermal stress, the animals remain standing in the air, at each emersion and avoiding contact with water (fig 6A; fig. 6B). When the crabs are in a heat stress situation, and migrate to the air environment they stand in that environment. Possibly, these animals adopt this behavior to delay dehydration and to avoid that the already high metabolism increases, and in this way they can delay the need to return to the water, being able to stay longer in the air environment (Fig.7).

Previous studies have shown that *N. granulata* uses emersion behavior to evade other stressor conditions in water. In hypoxia, this crab took advantage of the possibility of leaving this stressful environment, migrating to the air zone. The crab increased the average time they stayed in the air environment at each emersion [21]. However, the average time that this crab stayed at each emergency on thermal stress was substantially higher than in hypoxia situation. This fact corroborates with the idea that crabs evaded the aquatic environment

to cool body temperature [11;46] . In this way, the emergence behavior is an important resource for the crabs to survive with the increase in temperature.

5. Acknowledgments:

HALAL, L.M. was a fellow by CAPES. NERY, L.E.M is productivity fellow from CNPq (PQ 310830/2017-6)

6. References:

- [1] S. VijayaVenkataRaman, S. Iniyar, R. Goic, A review of climate change, mitigation and adaptation. *J. Renew. Sustain. Energy*, 16(1) (2012). 878-897.
- [2] M. J. Angilletta Jr, P. H., Niewiarowski, C. A. Navas, The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Therm. Biol.*, 27(4) (2002) 249-268.
- [3] G. N. Somero, Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”, *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* 139(3), (2004) 321-333.
- [4] J. P. Cumillaf, . lanc, , aschke, . Ge auer, . D a , D. e, . E. Chimal, . ásque , C., Thermal biology of the sub-polar–temperate estuarine crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea: Decapoda: Varunidae). *Biol. Open* (2016) 1-9.
- [5] J. H. Stillman, A comparative analysis of plasticity of thermal limits in porcelain crabs across latitudinal and intertidal zone clines. *Int. Congr. Ser.* 1275, (2004) 267-274. Elsevier.
- [6] W. W. ey nolds, . E. Casterlin, ehavioral thermoregulation and the “final preferendum” paradigm. *Am. Zool.*, 19(1) (1979) 211-224.
- [7] H. A. Woods, M. E. Dillon, S. Pincebourde, The roles of microclimatic diversity and of behavior in mediating the responses of ectotherms to climate change. *J. Therm. Biol.* 54 (2015) 86-97.
- [8] G. N. Somero, The physiology of global change: linking patterns to mechanisms. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4 (2012) 39-61
- [9] F. Seebacher, C. R White, C. E. Franklin, Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nat. Clim. Chang.*, 5 (1), (2015) 61.
- [10] E. W. Taylor, M. G. Wheatly The behaviour and respiratory physiology of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) at moderately high temperatures. *J. Comp. Physiol. B* 130(4), (1979) 309-316.

- [11] C. L. Thurman, Evaporative water loss, corporal temperature and the distribution of sympatric fiddler crabs (*Uca*) from south Texas. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.*, 119 (1) (1998) 279-286.
- [12] T. Luppi, C. Bas, A. M. Casariego, M. Albano, J. Lancia, M. Kittlein, A. Rosenthal, N. Farías, E. Spivak, O. Iribane, The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgol. Mar. Res.* 67(1) (2013) 1-15.
- [13] C.M. Wood, D. J. Randall, Haemolymph gas transport, acid-base regulation, and anaerobic metabolism during exercise in the land crab (*Cardisoma carnifex*). *J. Exp. Zool. A Ecol. Genet. Physiol.* 218(1) (1981) 23-35.
- [14] C. M. Luquet, C. O. Cervino, M. Ansaldo, V. C. Pereyra, R. E. Dezi, Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. *Comp. Biochem. Physiol., Part. A Mol. Integr. Physiol.* 121(4) (1998) 385-393.
- [15] G. N. Somero, E. Dahlhoff, J. J. Lin, Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal optima and tolerance ranges. A.F. (Eds.), *Animals and Temperature: Phenotypic and evolutionary adaptation*. University Press, Cambridge (2008) 53–78
- [16] F. Seebacher, C. R. White, C. E. Franklin, Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nat. Clim. Chang.* 5(1), (2015) 61-66.
- [17] E. Berger. *Aquaculture of Octopus species: present status, problems and perspectives*. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), (2011) 384-399.
- [18] L. I. Crawshaw, R. N. Rausch, L. P. Wollmuth, E. J. Bauer, (1992). Seasonal rhythms of development and temperature selection in larval bullfrogs, *Rana catesbeiana* Shaw. *Physiol. Zool.*, 65(2), 346-359.
- [19] M. Cuculescu, D. Hyde, K. Bowler, Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas* *J. Therm. Biol.* 23(2) (1998) 107-110.
- [20] E. A. Santos, B. Baldisseroto, A. Blanchini, E. P. Colares, L. E. Nery, G. C. Manzoni, Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* (1987) 88(1), 21-25.
- [21] T. M. de Lima, M. A. Geihs, L. E. M. Nery, F. E. Maciel, F. E., Air exposure behavior of the semiterrestrial crab *Neohelice granulata* allows tolerance to severe hypoxia but not prevent oxidative damage due to hypoxia–reoxygenation cycle. *Physiol. Behav.* (2015) 151, 97-101

- [22] R. B. Miranda, Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a ionorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil (1994) 171. Masters dissertation.
- [23] C. Odebrecht, P. C. Abreu, J. Carstensen, Retention time generates short-term phytoplankton blooms in a shallow microtidal subtropical estuary. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 162 (2015) 35-44.
- [24] F. D'Incao, M. L. Ruffino, K. G.da Silva, K. G., A. C.Braga, Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161(2), (1992) 179-188.
- [25] A. J. Southward, Note on the temperature tolerances of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *J. Marine Biol. Ass. U. K.* 37(1), (1958) 49-66.
- [26] B. A. Foster, Tolerance of high temperatures by some intertidal barnacles. *Mar. Biol.* 4(4) (1969) 326-332.
- [27] J. Hansen, M. Sato, R. Ruedy, (2012). Perception of climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(37) (2012) 2415-2423.
- [28] R. S. Hopkin, S. Qari, K. Bowler, D. Hyde, M. Cuculescu, M. Seasonal thermal tolerance in marine Crustacea. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 331(1) (2006) 74-81.
- [29] D. Barua, S. A. Heckathorn, Acclimation of the temperature set-points of the heat-shock response. *J. Therm. Biol.*, 29(3), (2004)185-193.
- [30] Tagatz, M. E. Some relations of temperature acclimation and salinity to thermal tolerance of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 98(4) (1969) 713-716.
- [31] D. Claussen, Thermal acclimation in ambystomatid salamanders. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol* 58(4) (1977) 333-340.
- [32] T. L. Beitinger, W. A. Bennett, Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environ. Biol. Fishes*, 58(3), (2000) 277-288.
- [33] J. H. Stillman, G. N. Somero, (2000). A comparative analysis of the upper thermal tolerance limits of eastern Pacific porcelain crabs, genus *Petrolisthes*: influences of latitude, vertical zonation, acclimation, and phylogeny. *Physiol. Biochem. Zool.* 73(2), (2000) 200-208.
- [34] R. A. González, F. Díaz, A. Licea, A. D. Re; L. N. Sánchez; Z. García-Esquivel, Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *J. Therm. Biol.*, 35(5), (2010) 218-224.

- [35] J. Halperin, M. Ansaldo, G. N. Pellerano, C. M. Luquet, Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851—physiological and morphological studies. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol* 126(3), (2000) 341-349.
- [36] T. A. Luppi, E. D. Spivak, K. Anger, Experimental studies on predation and cannibalism of the settlers of *Chasmagnathus granulata* and *Cyrtograpsus angulatus* (Brachyura: Grapsidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* 265(1) (2001) 29-48.
- [37] E. B. Edney, The water and heat relationships of fiddler crabs (*Uca* spp.). *Trans. R. Soc. S. Afr*, 36(2), (1961) 71-91.
- [38] R. B. Cowles, C. M. Bogert, A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist* 83 (1944) 261-296.
- [39] A. L. Payette, I. J. McGaw, Thermoregulatory behavior of the crayfish *Procambarus clarki* in a burrow environment. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol*, 136 (3) (2003) 539-556.
- [40] C. R. Bridges *Ecophysiology of intertidal fish*. Springer, Dordrecht (1993) 375-400.
- [41] M. D. Sayer, Adaptations of amphibious fish for surviving life out of water. *Fish and Fisheries*, 6(3) (2005) 186-211.
- [42] S. Morris, The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 131(4) (2002) 559-570.
- [43] I. J. McGaw, Behavioral thermoregulation in *Hemigrapsus nudus*, the amphioceanic purple shore crab. *Biol. Bull* 204(1) (2003). 38-49.
- [44] L. A. Kivivuori, Temperature selection behaviour of cold- and warm-acclimated crayfish [*Astacus astacus* (L.)]. *J Therm Biol*. 19(5) (1994). 291-297.
- [45] D. J. Gibson, E. V. Sylvester, A. J. Turko, G. J. Tattersall, P. A. Wright, Out of the frying pan into the air—emersion behaviour and evaporative heat loss in an amphioceanic mangrove fish (*Ryptoleias marmoratus*). *Biol. Lett.*, 11(10), (2015) 20150689.
- [46] D. E. Bliss, Transition from water to land in decapod crustaceans. *Am. Zool.* 8(3), (1968) 355-392.

4. Discussão geral:

A temperatura do planeta esta aumentando, e as ondas de calor estão mais frequentes e duradouras. As zonas costeiras também estão inseridas nesse cenário global, sendo um dos ecossistemas mais ameaçados pelas mudanças climáticas (IPCC 2001). A zona intermareal, é caracterizada por apresentar variações abruptas de muitas variáveis abióticas, como a temperatura. Nesse ambiente, os animais estão sujeitos à exposição a estresse térmico durante a maré baixa (Denny e Wethey, 2001). Já é bem conhecido que a temperatura é capaz de influenciar em vários processos fisiológicos (Newell e Branch, 1980) e por esta razão, é interessante compreender como as mudanças climáticas vão afetar esse ambiente e até que ponto o aumento de temperatura irá interferir nas relações ecológicas dessa região.

O caranguejo *Neohelice granulata* habita a zona intermareal das regiões costeiras do Oceano Atlântico, desde o sudeste brasileiro até a Patagônia na Argentina (Spivak, 2010). Devido a sua ampla distribuição, animais são capazes de viver em regiões de clima tropical e subtropical, sendo assim os limites térmicos desse animal podem ser bem distantes. Nesse trabalho, observamos uma resposta homogênea desses caranguejos, aclimatados a 20°C, ao aumento de temperatura, pois os animais perdem a capacidade de tolerar e há mortalidade numa pequena amplitude térmica, demonstrando que a temperatura é um fator ambiental importante e extremamente seletivo para esses animais. Esse resultado é semelhante ao encontrado em estudos anteriores em *N. granulata* (Miranda *et al.*, 1994). A temperatura da água, no ambiente onde eles vivem no estuário da Lagoa do Patos é extremamente variável, oscilando entre de 16 a 24°C na primavera de 2004 e entre 21 e 29°C no verão de 2005 e em alguns momentos do ano, a temperatura pode ultrapassar 30°C (D'Incao *et al.*, 1992; Fujita e Odebrecht, 2007), portanto, nossos resultados corroboram com a ideia de que os animais que habitam a

zona intertidal, vivem perto dos limites de termotolerância (Southward, 1958; Foster, 1969).

À medida que as características ambientais são alteradas, como por exemplo, a temperatura, como consequência das mudanças climáticas, os animais respondem a essa variação com base nas suas características fisiológicas e comportamentais (Somero, 2012). No entanto, a resposta ao aumento de temperatura não é estática, e pode ser alterada quando se leva em consideração a história térmica de cada animal.

A capacidade de aclimatar-se às diferentes condições abióticas enfrentadas pelos animais pode torna-los mais resilientes, para que se estabeleçam em habitats onde precisam enfrentar condições ambientais extremas. De fato, quando aclimatamos *N. granulata* a 30°C, observamos que a TL₅₀ aumentou significativamente (fig 1). Nossos resultados vão ao encontro da ideia de que a aclimação térmica pode aumentar os limites térmicos de muitos ectotérmicos (Hopkin *et al.*, 2006). Ainda nesse sentido, diversos estudos demonstram que, assim como no nosso trabalho, a aclimação térmica aumentou a tolerância e a resistência de outras espécies de caranguejos, siris, lagostins, camarões, peixes, dentre outros ectotérmicos, à estresse térmico (Tagatz, 1969; Claussen, 1977; Beitinger e Bennett, 2000; Stilman e Somero, 2002; González, 2010).

Outro recurso empregado por muitos animais além da aclimação, e que os torna mais resilientes ao estresse térmico é a “termorregulação comportamental”. Animais evadem de ambientes que oferecem estresse térmico, migrando para microhabitats com temperaturas menos desagradável. O caranguejo *N. granulata* é um caranguejo semiterrestre, e portanto é capaz de passar períodos no ambiente terrestre e pode se utilizar desse recurso, por um período limitado, para evadir de ambientes que lhe causem algum desconforto. Embora *N. granulata* seja capaz de fazer incursões ao ambiente terrestres, não é completamente adaptado para ficar fora do ambiente aquático por um período longo. Após algum tempo no ambiente aéreo, a captação de O₂ se torna menos eficiente, além disso, a excreção de produtos nitrogenados só ocorre na água (Santos *et al.*, 1987; Morris, 2002), tornando-os dependente do

ambiente aquático. Além dos limites fisiológicos, que limitam o tempo de permanência dos caranguejos no ambiente aéreo, outro problema que os caranguejos enfrentam nesse ambiente, é que ficam mais vulneráveis a predação e ao canibalismo (Luppi *et al.*, 2001; Luppi *et al.*, 2013).

Até o momento se tem pouco conhecimento de como o comportamento de emersão pode ser importante para aumentar a termolerância dos animais, que vivem na zona intermareal, à altas temperaturas. Sabendo que os animais são capazes de trocar energia com o meio (Recordati e Bellini 2004), podemos inferir que os animais se utilizam do comportamento de emersão para perder calor para o meio, diminuindo sua temperatura corpórea. A perda de água através da evaporação promove o resfriamento corporal, transformando calor sensível em calor latente, consumindo 600 calorias por grama de água evaporada.

Observamos que a possibilidade de emergir para o ambiente aéreo quente acarreta em um pequeno aumento na tolerância de *N. granulata*. Quando o caranguejo teve a possibilidade de migrar para o ar fresco, houve um aumento ainda maior da sua tolerância (fig 2A). Certamente, no ambiente aéreo fresco, a perda de calor corporal é mais eficiente, e provavelmente mais rápida, do que num ambiente aéreo quente, possibilitando que o animal mantenha a homeostasia.

Nos nossos resultados, observamos que houve 23.3% e 100% de mortalidade nos animais aclimatados a 30°C e submersos a 35°C e 37°C respectivamente (fig.1), podemos considerar que o efeito sinérgico da “termorregulação comportamental” e aclimação a uma temperatura mais elevada (30°C), aumentaram mais ainda a tolerância e resistência desses caranguejos independente da temperatura do ar tendo em vista que não houve mortalidade dentre esses animais que tinham a possibilidade de sair da água. Este fato comprova a importância da aclimação para o aumento da tolerância desses animais, ainda que com a possibilidade de emersão. Provavelmente a emersão torna os animais mais resistentes, porque enquanto o caranguejo esta no ambiente aéreo evapora a água, através da carapaça, arrefecendo a temperatura corpórea, como foi demonstrado em estudos anteriores (Edney, 1961; Thurman, 1998). Além disso, a aclimação térmica deve ter preparado o

organismo para um estresse mais intenso, tornando os caranguejos mais resistentes.

Quando os animais são submetidos a uma temperatura tão alta, que atinge os limites térmicos críticos, esses animais perdem a capacidade de controlar seus movimentos, e conseqüentemente ficam incapazes de se esquivar de situações que irão leva-los à morte (Cowles e Bogert 1944). Assim sendo, só houve 100% de mortalidade nos caranguejos que não tinham oportunidade de deixar a água quente para um ambiente aéreo onde a temperatura estava mais baixa do que da água, quando os animais perderam a capacidade de controlar os movimentos e não conseguiram emergir.

No nosso trabalho, quando o caranguejo foi exposto a água e ar a 20°C transitou entre o ambiente aquático e o ambiente aéreo, mas permaneceu mais tempo no ambiente aquático assim como já foi observado em um estudo anterior (Lima *et al.*, 2015). Quando expostos a água onde a temperatura estava mais elevada (35°C), os caranguejos permaneceram mais tempo no ambiente aéreo independente da temperatura do o ar (fig. 3A). No entanto, quando a temperatura do ar estava alta, o caranguejo transitou mais pela arena, e como a diferença entre as temperaturas do ambiente aéreo e aquático eram baixas. Dessa forma, como esses animais permaneceram mais tempo parados nesse ambiente, esses animais emergiram menos vezes do que os animais do controle (3B; 3C). Esse padrão de comportamento é diferente do comportamento adotado pelo lagostin *Procambarus clarki* (Payette e McGaw, 2003) que também utiliza o comportamento como uma forma de termorregular, aumentando o numero de incursões ao ambiente terrestre. Apesar do comportamento de emersão do lagostin ter um perfil diferente do comportamento de *N. granulata*, ambos utilizaram o ambiente aéreo para arrefecer a temperatura corpórea através da evaporação de água. Essa estratégia de deixar a água para resfriar a temperatura corporal, também pode ser utilizada por diversos peixes, que vivem na zona intermareal e são capazes de fazer pequenas incursões ao ambiente aéreo e utilizam o comportamento de emersão para resfriar a temperatura corpórea através de perda de água por evaporação (Bridges, 1993; Sayer,2005).

Nos experimentos de comportamento com os animais aclimatados a 30°C, observamos que esses animais permaneceram predominantemente no

ambiente aéreo (fig. 4A). No entanto, quando a temperatura do ar estava mais próxima a da água, os caranguejos transitaram mais entre a água e o ar em relação aos animais em água 35°C e ar a 20°C (fig. 4B; 4C), que aproveitaram o ambiente aéreo ótimo, para arrefecer sua temperatura corpórea, provavelmente os animais que estavam no ambiente aéreo mais quente estavam com a taxa metabólica mais alta, do que os animais que estão em um ambiente aéreo mais frio, e os animais produziram mais metabólitos que só podem ser excretados na água (Santos *et al.*, 1986; Morris, 2002). Essa resposta é semelhante ao que foi visto no caranguejo *Hemigrapsus nudus*, onde a temperatura de aclimação aumentou a tolerância desses animais, mas não aumentou a faixa de a temperatura capaz de provocar a evasão dos caranguejos a altas temperaturas (McGaw, 2003). Diferentemente dos nossos resultados, quando o peixe anfíbio *Kryptolebias marmoratus* é aclimatado a temperatura mais alta, responderam com o comportamento de emersão a temperaturas mais altas do que os animais aclimatados a uma temperatura mais baixa (Gibson *et al.*, 2015). Da mesma forma, quando o lagostin *Astacus astacus*, previamente aclimatados a temperatura mais alta evitam temperaturas mais altas do que os animais aclimatados a temperaturas mais baixas (Kivivuori, 1994). Nosso objetivo foi verificar como *N. granulata* responde a um estresse térmico agudo, dessa forma, tanto os animais previamente aclimatados a uma temperatura mais alta como os animais aclimatados a temperatura mais baixa, estavam sob um estresse térmico intenso, e provavelmente, por esse motivo não observamos forte influência da aclimação térmica no comportamento de evasão a alta temperatura da água no *N. granulata*.

Estudos anteriores demonstraram que a temperatura de aclimação, altera a os limites térmicos, e até mesmo a preferência térmica de diversos animais (Reynolds e Casterlin, 1979). Nos nossos resultados, entretanto, observamos que quando *N. granulata* aclimatado a 30°C teve a possibilidade de deixar a água, que estava na mesma temperatura de aclimação, permaneceu mais tempo no ambiente aéreo do que na água (fig 4A e 5) demonstrando que essa temperatura não é a ideal para manutenção da homeostasia.

Todos animais aclimatados a 20°C, morreram quando mantidos submersos a 35°C, e também houve mortalidade quando os animais foram submetidos a água a 35°C, com a possibilidade de migrar para o ar quente, dessa forma, esses caranguejos não são capazes de tolerar essa situação. Sendo assim, apesar da perda de água e a necessidade de reter CO₂ e amônia, no ambiente aéreo, os animais evitam ao máximo as incursões à zona aquática, independente da temperatura do ar.

Muitos animais respondem a aumentos repentinos de temperatura sintetizando um pequeno conjunto de proteínas chamadas proteínas de choque térmico (HSP), responsáveis por auxiliar na manutenção da homeostase celular em situações de estresse térmico (Parsell, 1993), em especial a proteína HSP70 incumbida de ajudar no envelhecimento e impedir a síntese de proteínas malformadas (Freitas et al., 2012). Durante o período de aclimação, os animais sintetizam essas proteínas, e com isso, são capazes de enfrentar um estresse mais agudo.

Os animais aclimatados a 30°C submersos a 35°C apresentam uma baixa taxa de mortalidade, e toleram essa temperatura de água quando estão livre expostos, independente da temperatura do ar. Então, apesar de preferir o ambiente aéreo, quando os animais tiveram acesso ao ar quente, permaneceram menos tempo na zona aérea a cada emersão, e migraram mais vezes à zona aquática, provavelmente para evitar a desidratação, captar mais água para armazenar na câmara branquial e liberar as excretas. Com isso, podemos concluir que quando os animais estão em estresse térmico, aumentam o número de saídas da água aumentando o tempo de permanência no ambiente aéreo, mas não evitam o ambiente aquático, no entanto quando os animais estão em um estresse térmico mais intenso, os animais permanecem parados no ambiente aéreo, a cada emersão e evitando o contato com a água (fig 6A e 6B).

Quando os caranguejos estão em uma situação de estresse térmico, migram para o ambiente aéreo e ficam parados nesse ambiente. Provavelmente os animais adotam esse comportamento, para retardar a desidratação e evitar que o metabolismo, que já está alto, aumente ainda mais, e dessa forma eles podem retardar a necessidade de voltar para a água, podendo permanecer mais tempo no ambiente aéreo (fig. 7). Esses resultados

corroboram com a ideia de que esses animais estão em uma situação muito estressora, e pode ser um problema no ambiente, pois quando permanece parado no ambiente aéreo, ficam mais suscetíveis a predação.

Estudos prévios demonstraram que *N. granulata* utiliza o comportamento de emersão para evadir de outras condições estressoras na água. Em hipóxia, esse caranguejo se aproveitou da possibilidade de deixar esse ambiente estressor, migrando pra zona aérea. O caranguejo aumentou o tempo médio de permanência no ambiente aéreo a cada emersão (Lima, et al., 2014). No entanto, o tempo médio que o caranguejo permaneceu a cada emergência em estresse térmico foi substancialmente maior, do que em hipóxia. Corroborando com a ideia de que os animais evadiram do ambiente aquático para arrefecer a temperatura corpórea (Thurman,1998; Bliss 1968). Desta maneira, o comportamento de emersão é um recurso importante para que os animais consigam sobreviver com o aumento da temperatura.

Com a intensificação do aquecimento global e o aumento da temperatura ambiente os animais vão vivenciar cada vez mais situações de estresse térmico mais intensas do que as que já vivenciam agora. Os animais que podem deixar os ambientes estressores, migram para um ambiente onde a temperatura esteja mais amena. Dessa forma, um aumento de temperatura gradativo, pode ocasionar uma pressão nesses animais, direcionando-os para as regiões mais frias. O caranguejo *N. granulata* é uma espécie chave na transferência de energias (D'Incao et al, 1990), esses caranguejos tem uma grande importância ecológica nesse ambiente, participando da manutenção dos ciclos biogeoquímicos, através da bioturbação e herbivoria e com isso influenciam na composição da biomassa desse ambiente (Fanjul et al., 2011; Alberti et al.,2015). Desta maneira, com a evasão de *N. granulata* para outras regiões, iria ocorrer um desbalanço entre as relações ecológicas no ambiente, afetando todo ecossistema, e provavelmente muitas animais não conseguiriam sobreviver nesse ambiente. Portanto, é necessário analisar como essa espécie, que é muito importante no ambiente em que vive, irá responder com a intensidade das mudanças climáticas.

Diante do exposto, podemos concluir que o caranguejo *Neohelice granulata*, se utiliza do comportamento de emersão para aumentar a tolerancia e a resistência em estresse térmico, e que a aclimatação térmica é capaz de

aumentar ainda mais a tolerância e resistência desses animais a essa situação. No entanto, não sabemos se o comportamento de emersão permite a manutenção dos processos fisiológicos evitando danos ao organismo. Dessa forma, se torna interessante avaliar a integridade dos sistemas fisiológicos desses animais em estresse térmico, com a possibilidade de emergir, para compreendermos melhor como as mudanças climáticas irão afetar esses caranguejos.

Referências Bibliográficas:

Adolph, S. C. (1990). Influence of behavioral thermoregulation on microhabitat use by two *Sceloporus* lizards. *Ecology*, 71(1), 315-327.

Alberti, J., Daleo, P.; Fanjul, E.; Escapa, M.; Botto, F.; Iribarne, O. (2015). Can a single species challenge paradigms of salt marsh functioning?. *Estuaries and coasts*, 38(4), 1178-1188.

Alcântara, C. R.; Ferreira, D. V. R.; da Silva, G. J. F.; de Almeida, H. A. (2012). Aquecimento Global ou Variabilidade Climática Natural na Microrregião de Juazeiro-BA?(Global Warming or Natural Climate Variability on Juazeiro Microregion in Bahia State?). *Revista Brasileira de Geografia Física*, 5(3), 572-585.

Angilletta Jr, M. J.; Niewiarowski, P. H.; Navas, C. A. (2002). The evolution of thermal physiology in ectotherms. *Journal of thermal Biology*, 27(4), 249-268.

Angilletta, M. J. (2009). Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. *Oxford University Press*.

Angilletta, M. J.; Cooper, B. S.; Schuler, M. S.; Boyles, J. G (2010). The evolution of thermal physiology in endotherms. *Front Biosci E*, 2, 861-881.

Asmus, M. L. (1997). Coastal plain and Patos Lagoon. In *Subtropical Convergence Environments*. Springer, Berlin, Heidelberg, 9-12.

Baird, O. E.; Krueger, C. C. (2003). Behavioral thermoregulation of brook and rainbow trout: comparison of summer habitat use in an Adirondack River, New York. *Transactions of the American Fisheries Society*, 132(6), 1194-1206.

Barry, J. P.; Baxter, C. H.; Sagarin, R. D.; Gilman, S. E. (1995). Climate-related, long-term faunal changes in a California rocky intertidal community. *Science*, 267(5198), 672-675.

Beitinger, T. L.; Bennett, W. A. (2000). Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58(3), 277-288.

- Berger, E. (2011). Aquaculture of Octopus species: present status, problems and perspectives. *The Plymouth Student Scientist*, 4(1), 384-399.
- Bennett, A. F.; Ruben, J. A. (1979). Endothermy and activity in vertebrates. *Science*, 206(4419), 649-654.
- Bettiol W.; Hamada, E.; Angelotti, F.; Auad, A. M.; Ghini, R. (2017) Aquecimento global e problemas fitossanitários." *Embrapa Meio Ambiente-Livro científico*, 440-452
- Bliss, D. E. (1968). Transition from water to land in decapod crustaceans. *American Zoologist*, 8 (3), 355-392.
- Blouin-Demers, G.; Weatherhead, P.J. (2001). Thermal ecology of back rat snakes (*Elaphe obsoleta*) in a thermally challenging environment. *Ecology*, 82(11), 3025-3043.
- Blouin-Demers, G.; Nadeau, P. (2005). The cost–benefit model of thermoregulation does not predict lizard thermoregulatory behavior. *Ecology*, 86(3), 560-566.
- Bonilha, L. E.; Asmus, M. L. (1994). Modelo ecológico do fitoplâncton e zooplâncton do estuário da Lagoa dos Patos, RS. *Publ Academia de Ciências do Estado de São Paulo*, 87, 347-362.
- Boschi, E. E. (1964). Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (R. Argentina). *Boletín del Instituto de Biología Marina*, (6), 1-99.
- Botto, F.; Iribarne, O. (1999). Effect of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* (Dana) on the benthic community of a SW Atlantic coastal lagoon. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(2), 263-284.
- Bryan, J. D.; Kelsch, S. W.; Neill, W. H. (1990). The maximum power principle in behavioral thermoregulation by fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 119(4), 611-621.
- Buckley, L. B. (2007). Linking traits to energetics and population dynamics to predict lizard ranges in changing environments. *The American Naturalist*, 171(1), 1-19.
- Cameron, J. N. (1981). Brief introduction to the land crabs of the Palau Islands: stages in the transition to air breathing. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 218(1), 1-5.
- Chao, L. H.; Pereira, L. E.; Vieira, J. P. (1985). Estuarine fish community of the dos Patos Lagoon, Brazil. A baseline study. *Fish community ecology in estuaries and coastal lagoons: Towards an ecosystem integration*, 429-450.
- Claussen, D. (1977). Thermal acclimation in ambystomatid salamanders. *Comparative Biochemistry and Physiology--Part A: Physiology*, 58(4), 333-340.

- Conti, J. B. (2011). Considerações sobre as mudanças climáticas globais. *Revista do Departamento de Geografia*, 16, 70-75.
- Costa, C. S. B.; Davy, A. J. (1992). Coastal saltmarsh communities of Latin America. In *Coastal plant communities of Latin America*, 179-199.
- Costa, T. R.; Carnaval, A. C.; Toledo, L. F. (2012). Mudanças climáticas e seus impactos sobre os anfíbios brasileiros. *Revista da Biologia*.
- Cowles, R. B.; Bogert, C. M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bulletin of the AMNH*; 83(5).
- Crawshaw, L. I., Hammel, H. T. (1971). Behavioral thermoregulation in two species of antarctic fish. *Life Sciences*, 10(17), 1009-1020.
- Crawshaw, L. I., Rausch, R. N., Wollmuth, L. P., & Bauer, E. J. (1992). Seasonal rhythms of development and temperature selection in larval bullfrogs, *Rana catesbeiana* Shaw. *Physiological zoology*, 65(2), 346-359.
- Cuculescu, M.; Hyde, D.; Bowler, K. (1998). Thermal tolerance of two species of marine crab, *Cancer pagurus* and *Carcinus maenas*. *Journal of Thermal Biology*, 23(2), 107-110.
- Cumillaf, J. P.; Blanc, J.; Paschke, K.; Gebauer, P.; Díaz, F.; Re, D.; Chimal M. E.; Rosas, C. (2016). Thermal biology of the sub-polar–temperate estuarine crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea: Decapoda: Varunidae). *Biology open*, 1-9.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(18), 6668-6672.
- Díaz, H., Rodríguez, G. (1977). The branchial chamber in terrestrial crabs: a comparative study. *The Biological Bulletin*, 153(3), 485-504.
- Díaz, F.; Re, A. D.; Salas, A.; Galindo-Sanchez, C. E.; Gonzalez, M. A.; Sanchez, A., Rosas, C. (2015). Behavioral thermoregulation and critical thermal limits of giant keyhole limpet *Megathura crenulata* (Sowerby 1825)(Mollusca; Vetigastropoda). *Journal of thermal biology*, 54, 133-138.
- D’Incao, . ; Silva, K. G.; Ruffino, M. L; Braga, A. C.. (1990). Hábito alimentar do caranguejo *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 na barra do Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). *Atlântica*, 12(2), 85-93.
- Doney, S. C.; Ruckelshaus, M.; Duffy J. E.; Barry J. P.; Chan, F.; English, C. A.; Galindo H. M.; Grebmeier J. G.; . Hollowed A. B.; Knowlton N.; Polovina J.; Rabalais N. N.; Sydeman W.J. (2011). Climate change impacts on marine ecosystems. 11-37
- Easterling, D. R., Horton, B.; Jones, P. D.; Peterson, T. C.; Karl, T.R.; D. E. Parker, M. J.; Razuvayev, V.; Plummer, N; Jamason, P; Folland, C. K (1997).

Maximum and minimum temperature trends for the globe. *Science*, 277 (5324), 364-367.

Easterling, D. R., Meehl, G. A.; Parmesan, C.; Changnon, S. A.; Karl, T. R.; Mearns, L. O. (2000). Climate extremes: observations, modeling, and impacts. *Science*, 289(5487), 2068-2074.

Edney, E. B. (1961). The water and heat relationships of fiddler crabs (*Uca* spp.). *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 36(2), 71-91.

Escapa, M., Iribarne, O., Navarro, D. (2004). Effects of the intertidal burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on infaunal zonation patterns, tidal behavior, and risk of mortality. *Estuaries*, 27(1), 120-131.

Espina, S.; Vanegas, C. (2005). Ecofisiología y contaminación. *Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias, México*, 53-78.

Fanjul, E.; Bazterrica, M. C.; Escapa, M.; Grela, M. A.; Iribarne, O. (2011). Impact of crab bioturbation on benthic flux and nitrogen dynamics of Southwest Atlantic intertidal marshes and mudflats. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(4), 629-638.

Fujita, C. C.; Odebrecht, C. (2007). Short term variability of chlorophyll a and phytoplankton composition in a shallow area of the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Atlântica (Rio Grande)*, 29(2), 93-106.

Foster, B. A. (1969). Tolerance of high temperatures by some intertidal barnacles. *Marine Biology*, 4(4), 326-332.

González, R. A.; Díaz, F.; Licea, A.; Re, A. D.; Sánchez, L. N.; García-Esquivel, Z. (2010). Thermal preference, tolerance and oxygen consumption of adult white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to different acclimation temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 35(5), 218-224.

Gutiérrez, J. L.; Jones, C. G.; Groffman, P. M.; Findlay, S. E.; Iribarne, O. O.; Ribeiro, P. D.; Bruschetti, C. M. (2006). The contribution of crab burrow excavation to carbon availability in surficial salt-marsh sediments. *Ecosystems*, 9(4), 647-658.

Gvoždík, L. (2011). Plasticity of preferred body temperatures as means of coping with climate change?. *Biology Letters*, rsbl20110960.

Halperin, J., Ansaldo, M.; Pellerano, G. N.; Luquet, C. M. (2000). Bimodal breathing in the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* Dana 1851—physiological and morphological studies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 126(3), 341-349.

- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R. (2012). Perception of climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37), 2415-2423.
- 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. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 162, 76-87.
- Helmuth, B.; Harley, C. D., Halpin, P. M., O'donnell, M., Hofmann, G. E., Blanchette, C. A (2002). Climate change and latitudinal patterns of intertidal thermal stress. *Science*, 298(5595), 1015-1017.
- Hopkin, R. S.; Qari, S.; Bowler, K.; Hyde, D.; Cuculescu, M. (2006). Seasonal thermal tolerance in marine Crustacea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331(1), 74-81.
- Huey, R. B. (1982). Temperature, physiology, and the ecology of reptiles. In *Biology of the Reptilia*, 25-91.
- Huner, N. P.; Öquist, G.; Sarhan, F. (1998). Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science*, 3(6), 224-230.
- Kennish, M. J. (1986). Ecology of estuaries, Volume I: Physical and chemical aspects. *CRC Press, Inc., Boca Raton FL*. 1986. 254.
- Kivivuori, L. A. (1994). Temperature selection behaviour of cold-and warm-acclimated crayfish [*Astacus astacus* (L.)]. *Journal of Thermal Biology*, 19(5), 291-297.
- Janzen, F. J. (1994). Climate change and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(16), 7487-7490.
- Jobling, M. (1981). Temperature tolerance and the final preferendum—rapid methods for the assessment of optimum growth temperatures. *Journal of fish biology*, 19(4), 439-455.
- Lima, T. M.; Geihs, M. A.; Nery, L. E. M.; Maciel, F. E. . (2015). Air exposure behavior of the semiterrestrial crab *Neohelice granulata* allows tolerance to severe hypoxia but not prevent oxidative damage due to hypoxia–reoxygenation cycle. *Physiology & behavior*, 151, 97-101.
- Liu, Z. M.; Wang, G. Z.; Wu, L. S.; Zeng, Z. S.; Chen, X. L. (2013). Seasonal change in mitochondrial function and metabolic enzyme activity of different populations of the mud crab, *Scylla paramamosain*, from China. *Aquaculture*, 376, 68-75.
- Luppi, T.; Bas C.; Casariego, A. M.; Albano, A.; Lancia, J.; Kittlein, M.; Rosenthal, A.; Farias, N.; Spivak, E; Iribane, O., (2013). The influence of habitat, season and tidal regime in the activity of the intertidal crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*. *Helgoland Marine Research*, 67(1), 1-15

- Luquet, C. M.; Cervino, C. O.; Ansaldo, M.; Pereyra, V. C.; Kocmur, S.; Dezi, R. E. (1998). Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 121(4), 385-393.
- Lutterschmidt, W. I.; Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: data to support the onset of spasms as the definitive end point. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1553-1560.
- Marangoni, J. C.; Costa, C. S. B. (2010). Caracterização das atividades econômicas tradicionais no entorno das marismas no estuário da Lagoa dos Patos (RS). *Desenvolvimento e Meio Ambiente*, 21.
- Marshall, D. J.; Baharuddin, N.; McQuaid, C. D. (2013). Behaviour moderates climate warming vulnerability in high-rocky-shore snails: interactions of habitat use, energy consumption and environmental temperature. *Marine biology*, 160(9), 2525-2530.
- Martin, T. E. (1998). Are microhabitat preferences of coexisting species under selection and adaptive? *Ecology*, 79(2), 656-670.
- Martinetto, P.; Montemayor, D. I.; Alberti, J.; Costa, C. S.; Iribarne, O. (2016). Crab bioturbation and herbivory may account for variability in carbon sequestration and stocks in south west Atlantic salt marshes. *Frontiers in Marine Science*, 3, 122
- Mat, A. M.; Dunster, G. P.; Sbragaglia, V.; Aguzzi, J.; Horacio, O. (2017). Influence of temperature on daily locomotor activity in the crab *Uca pugilator*. *PloS one*, 12(4), e0175403.
- Mendonça, F. (2006). Aquecimento Global e suas manifestações regionais e locais: alguns indicadores da região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Climatologia*, 2, 71-86
- 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, Brasil. 171. Dissertação de Mestrado.
- Morris, S. (2002). The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4), 559-570.
- Muehe, D.; Neves, C. (2009). A zona costeira do Brasil e sua vulnerabilidade face à ocupação e às mudanças climáticas. *Espaço e Tempo: Complexidade e desafios do pensar e do fazer geográfico. Curitiba: ADEMADAN*, 425-439.
- Newell, R. C. (1973) Environmental factors affecting the acclimatory responses of ectotherms. Effects of temperature on ectothermic organisms. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 151-164.

Newell, R. C.; Branch, G. M. (1980). The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. In *Advances in marine biology*, 17, 329-396.

Nielsen, T. V.; McGaw, I. J. (2016). Behavioral thermoregulation and trade-offs in juvenile lobster *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin*, 230(1), 35-50.

Odebrecht, C.; Abreu, P. C.; Carstensen, J. (2015). Retention time generates short-term phytoplankton blooms in a shallow microtidal subtropical estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 162, 35-44.

O'brien, C. M.; Fox, C. J.; Planque, B.; Casey, J. (2000). Fisheries: climate variability and North Sea cod. *Nature*, 404(6774), 142-143

Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J. K., Thomas, C. D., Descimon, H., Huntley, B.; Kaila, L.; Kullberg, J.; Tammaru, T.; Tennen, W. J., Thomas, J. A.; Warren, M. (1999). Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming. *Nature*, 399(6736), 579-583.

Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37, 637-669.

Parsell, D. A.; Lindquist, S. (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual review of genetics*, 27(1), 437-496.

Pépino, M.; Goyer, K.; Magnan, P. (2015). Heat transfer in fish: are short excursions between habitats a thermoregulatory behaviour to exploit resources in an unfavourable thermal environment? *Journal of Experimental Biology*, 218(21), 3461-3467.

Pinto-Coelho, R. M.; Havens, K. (2016). *Gestão de Recursos Hídricos em Tempos de Crise*. Editora Artmed.

Planque, B.; Frédou, T. (1999). Temperature and the recruitment of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(11), 2069-2077.

Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132(4), 739-761.

Prosser, C. L. (Ed.). (1991). *Comparative animal physiology, environmental and metabolic animal physiology*. John Wiley & Sons.

Reynolds, W. W.; Casterlin, M. E. (1979). Behavioral thermoregulation and the "final preferendum" paradigm. *American zoologist*, 19(1), 211-224.

Rosa, L. C., Bemvenuti, C. E. (2005). Effects of the burrowing crab *Chasmagnathus granulata* (Dana) on meiofauna of estuarine intertidal habitats

of Patos Lagoon, Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 267-274.

Rozin, P. N.; Mayer, J. (1961). Thermal reinforcement and thermoregulatory behavior in the goldfish, *Carassius auratus*. *Science*, 134(3483), 942-943.

Santos, E. A.; Baldisseroto, B.; Blanchini, A.; Colares, E. P.; Nery, L. E.; Manzoni, G. C. (1987). Respiratory mechanisms and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 88(1), 21-25.

Santos, R. T. F. (2012). Mudanças climáticas e a zona costeira: uma análise do impacto da subida do nível do mar nos recursos hídricos – o caso do canal de São Francisco, Baía de Sepetiba, RJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), COPPE, Programa de Planejamento Energético, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Dissertação de Mestrado.

de Souza Freitas, W. E.; de Oliveira Fernandes, P. L.; Leite, G. A.; Dantas, J. I. A.; Pontes, C. A.; de Carvalho, C. A. C. (2012). Ação das Proteínas de Choque Térmico em frutos. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 8(2), 24-31.

Schmitt, A. C.; Santos, E. A. (1993). Behaviour and haemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 106(2), 337-342.

Seebacher, F.; White, C. R.; Franklin, C. E. (2015). Physiological plasticity increases resilience of ectothermic animals to climate change. *Nature Climate Change*, 5(1), 61.

Silbiger, N.; Munguia, P. (2008). Carapace color change in *Uca pugilator* as a response to temperature. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 355(1), 41-46.

Sinervo, B. Mendez-De-La-Cruz, F., Miles, D. B., Heulin, B., Bastiaans, E., Villagrán-Santa Cruz, M.; I Lara-Resendiz, R.; Martínez-Méndez, N.; Calderón-Espinosa, M. L.; Meza-Lázaro, R.N.; Gadsden, H.; Gadsden, J.L.; Morando, M.; Riva, I. J. Sepulveda, P.V.; Rocha, C. F. D.; Ibarguengoytia, N.; Puntriano, C. A.; Massot, C. M.; Lepetz, V.; Oksanen, T. A.; Chapple, G. D.; Bauer, A. M.; Branch, W. R.; Clobert, J.; Sites, J. W., (2010). Erosion of lizard diversity by climate change and altered thermal niches. *Science*, 328(5980), 894-899.

Spivak, E. D. (2010). The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, 64(3), 149.

Somero, G. N.; Dahlhoff, E. (2008). Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal. *Animals and temperature: Phenotypic and evolutionary adaptation*, 59, 53.

Somero, G. N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and comparative biology*, 42(4), 780-789.

Somero, G. N. (2012). The physiology of global change: linking patterns to mechanisms. *Annual Review of Marine Science*, 4, 39-61

Southward, A. J. (1958). Note on the temperature tolerances of some intertidal animals in relation to environmental temperatures and geographical distribution. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 37(1), 49-66.

Stillman, J. H.; Somero, G. N. (2000). A comparative analysis of the upper thermal tolerance limits of eastern Pacific porcelain crabs, genus *Petrolisthes*: influences of latitude, vertical zonation, acclimation, and phylogeny. *Physiological and Biochemical Zoology*, 73(2), 200-208.

Stillman, J. H. (2004). A comparative analysis of plasticity of thermal limits in porcelain crabs across latitudinal and intertidal zone clines. *International Congress Series* 1275, 267-274.

Tagatz, M. E. (1969). Some relations of temperature acclimation and salinity to thermal tolerance of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Transactions of the American Fisheries Society*, 98(4), 713-716.

Taylor, E. W.; Wheatly, M. G. (1979). The behaviour and respiratory physiology of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) at moderately high temperatures. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 130(4), 309-316.

Thurman, C. L. (1998). Evaporative water loss, corporal temperature and the distribution of sympatric fiddler crabs (*Uca*) from south Texas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(1), 279-286.

Valle-Levinson, A. (Ed.). (2010). *Contemporary issues in estuarine physics*. Cambridge University Press.

Vilas Boas, D.F. Distribuição e comportamento dos sais nutrientes, elementos maiores e metais pesados na Lagoa dos Patos, RS. 1990. 112f. Tese (Mestrado em Oceanografia Biológica) – FURG, Rio Grande, RS.

Vernberg, W. B.; Vernberg, F. J. (2012). *Environmental physiology of marine animals*. Springer Science & Business Media.

VijayaVenkataRaman, S.; Iniyar, S.; Goic, R. (2012). A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(1), 878-897.

Wood, C. M., Randall, D. J. (1981). Haemolymph gas transport, acid-base regulation, and anaerobic metabolism during exercise in the land crab

(*Cardisoma carnifex*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 218(1), 23-35.

Woods, H. A.; Dillon, M. E.; Pincebourde, S. (2015). The roles of microclimatic diversity and of behavior in mediating the responses of ectotherms to climate change. *Journal of Thermal Biology*, 54, 86-97.

Wuethrich, B. (2000). How climate change alters rhythms of the wild. *Science*, 287(5454), 793-795.