



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

Dissertação de Mestrado

EXPOSIÇÃO AO AMBIENTE AÉREO COMO ESTRATÉGIA CONTRA  
DANOS CAUSADOS PELA HIPÓXIA SEVERA EM *NEOHELICE*  
*GRANULATA*

Tábata Martins de Lima

*Dissertação defendida no âmbito do Programa  
de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas –  
Fisiologia Animal Comparada como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre.*

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

Rio Grande 2014

## Sumário

1. Agradecimentos.....	3
2. Resumo.....	5
3. Introdução geral.....	6
4. Objetivo geral.....	15
4.1 Objetivos específicos.....	15
5. Artigo .....	16
6. Discussão geral e perspectivas .....	36
7. Bibliografia da introdução geral e conclusão geral e perspectiva .....	38

## **1. Agradecimentos**

A minha família, meu pai Joel de Lima, primeiramente por ter me ensinado a buscar meus objetivos e lutar por meus sonhos sem nunca desrespeitar ao próximo e nunca esquecer a ética e o profissionalismo. Minha mãe, Jaqueline Martins de Lima, por sempre me encorajar a encarar novos desafios e lutar sempre pela minha felicidade. Meus irmãos, Nicolas, Gabriel e Giovana desculpem pela ausência e por não ver vocês crescerem a mana ama todos vocês.

Ao meu orientador Dr. Luís Eduardo Maia Nery que no meu último ano de graduação fez eu me apaixonar pela fisiologia e aceitou me orientar e participar dessa parte da minha carreira e da minha vida. Nunca vou poder expressar a admiração que tenho por você. Obrigada pela paciência, pelas explicações e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador Dr. Fábio Everton Maciel pela paciência, dicas e por ajudar a me tornar uma profissional melhor e por me aturar quando eu tinha medo de falar com o Carioca hehehe.

Ao Dr. Márcio Geihs por me acompanhar nos experimentos, laboratório e análises, pelas inúmeras explicações e horas dedicadas a me ajudar.

Aos Professores do programa de Pós graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos e pelo carinho, muitos de vocês serão lembrados para sempre como exemplo de profissionais. Um obrigada especial para os professores Elton Colares, José Monserrat, Marta Marques, Juliane Ventura, Daniela Barros e é claro meus orientadores, Carioca e Fábio, foi uma honra aprender com vocês.

Aos colegas da Salinha 2 (aos que já foram e aos que são), que fizeram parte dessa caminhada, obrigada pelas conversas, risadas, brincadeiras, brigas, discussões, desabafos e convivência.

A BFF Amanda Duarte, ou simplesmente “Manga”, que me aguenta desde a graduação (mesmo ela não querendo ser minha amiga). A sua amizade torna tudo muito mais fácil, obrigada pelos momentos de desabafos e pelo apoio.

A Viviane Duarte (vivi), mãe que eu adotei aqui em Rio Grande, que fez o papel de família quando eu não podia estar com a minha. Vivi, obrigado pelo carinho, pela preocupação e pela companhia e principalmente pelos churrascos maravilhosos hehehe.

Aos amigos da pós que trilharam esse caminho comigo. A Anahy Fazio que ingressou nessa jornada comigo e fez dela muito mais fácil. Florzinha, tu és um exemplo pra mim, tua curiosidade é contagiante e teu encanto com as coisas biológicas me divertiram muito nessa caminhada. E um molusco vai ser sempre um molusculo. A Gabriela Moraes, pelo carinho, pela amizade e pelos inúmeros trabalhos e seminários que fizemos juntas, você foi a melhor dupla ever. A chatinha da Rêh (Regina Coimbra), pela diversão, programas fotográficos, subways e dancinhas.

A todos meus amigos, pelo apoio que me deram e por tudo que passamos juntos, pois é graças a cada um de vocês que eu me tornei quem eu sou hoje e foi por causa de vocês que eu consegui percorrer esse caminho sem enlouquecer. Aos amigos de longe, obrigada por entenderem minha ausência, Gisele (dinda), Michelly, Rubia, Isabela.

A minha namorada, um obrigada especial. Conhecer você foi uma das melhores coisas que aconteceu nesse período. Obrigada pelo apoio e por estar comigo em todos os momentos, me aguentando nesses momentos de tensão. Você fez e faz meus dias muito melhores e mais divertidos. E não poderia esquecer nossos pets Bella, Campbell e Sol (porquinha de páscoa) pelo carinho incondicional.

Gostaria de agradecer a Banca por aceitar o convite e pelas colaborações, com certeza meu trabalho será muito melhor graças às sugestões de vocês.

## 2. Resumo

Ambientes aquáticos costeiros tendem a sofrer uma grande variação na disponibilidade de oxigênio, submetendo os animais que ali habitam a frequentes períodos de hipóxia e reoxigenação. Ambientes estuarinos são um exemplo desses ambientes que sofrem constante variações na concentração de oxigênio dissolvido. A diminuição ou falta de oxigênio disponível pode acarretar em diversos problemas para os animais, principalmente no período de retorno do oxigênio após um período de hipóxia. Entre esses problemas esta formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem causar danos ao interagirem com outras estruturas celulares como, por exemplo, a lipoperoxidação. O caranguejo semi-terrestre *Neohelice granulata* habita marismas de regiões estuarinas e dessa forma está constantemente exposto a alterações da disponibilidade de oxigênio nesse ambiente. Além disso, esta espécie possui a capacidade de permanecer exposto ao ar. Portanto, esta dissertação visou avaliar se o caranguejo *N. granulata* utiliza o ambiente aéreo quando exposto a hipóxia aquática severa e se essa estratégia de exposição ao ar é um mecanismo que aumenta a tolerância e resistência a hipoxia e se diminui os danos causados pelo ciclo de hipóxia e reoxigenação. Para isso os animais foram submetidos a uma arena com três ambientes delimitados (água, intermediário, terra) e foi avaliado mortalidade, tempo de utilização de cada ambiente e ocorrência de danos de lipoperoxidação. Quando expostos a água hipóxica ( $0,5 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ) com possibilidade de utilização do ambiente aéreo *N. granulata* passa um período de tempo maior no ambiente terrestre do que no aquático, o contrário do encontrado em condições de água normóxica ( $6,0 \text{ mg O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ ) também com livre acesso ao ar. Essa maior utilização do ambiente aéreo permite a sobrevivência total a hipóxia severa em 96h. Apesar de passarem um maior tempo no ambiente terrestre quando expostos a hipóxia, este tempo é intercalado com breves incursões a água, provavelmente devido a necessidade de excreção de  $\text{CO}_2$  e amônia. Porém, apesar de aumentar a taxa de sobrevivência, a utilização do ambiente aéreo quando expostos a hipóxia não diminui os danos de lipoperoxidação causados pelos ciclos de hipóxia e reoxigenação sofrido por esses indivíduos.

**Palavras chave:** Hipóxia, Exposição aérea, Lipoperoxidação, Caranguejo, Hipoxia/Reoxigenação.

### 3. Introdução Geral

O oxigênio é essencial para muitos seres vivos. O principal motivo é sua importância na produção de energia. A falta ou diminuição da disponibilidade dessa molécula pode interferir seriamente na distribuição de seres vivos nos ambientes, gerar danos bioquímicos e até levar os organismos a morte. No ambiente aquático o desafio é ainda maior, pois a água contém 33 vezes menos oxigênio que o ar. Somado a isso, a taxa de difusão do oxigênio na água é em torno de 300.000 vezes menor do que no ambiente aéreo (Jones, 1972). Em ambiente aquático, variações na concentração de oxigênio dissolvido (OD) ocorrem com maior frequência do que em ambientes aéreos, dificultando ainda mais a vida neste ambiente (Randall *et al.*, 2000). Níveis de OD menores que 2,8 mg/L, na água, caracterizam um ambiente hipóxico (Diaz e Rosenberg, 1995).

Estudos vêm sendo realizados e demonstram que o número de ambientes com baixo OD, tem aumentado em escala global com o passar dos anos. Entretanto, o número de áreas hipóxicas não é a única preocupação, outro dado importante que deve ser levado em consideração é o tamanho dessas áreas que também vem aumentando (Diaz e Rosenberg, 1995; Gray *et al.*, 2002; Wu, 2002) (Fig. 1). Uma das principais causas desse crescimento pode ser devido a um aumento de ações antrópicas, por exemplo, em regiões costeiras. Grande parte da população mundial habita zonas costeiras e muitas vezes acabam por despejar resíduos provenientes de esgotos, atividades agrícolas, atividades portuárias entre outras, diretamente nessas regiões gerando um aumento nas alterações nos níveis de OD. Regiões estuarinas são um exemplo típico de ambientes aquáticos com grande variação no OD, pois possui características de interação de águas continentais e marinhas. De fato, mangues e marismas apresentam, de maneira geral, baixa profundidade e grande teor de matéria

orgânica no sedimento, o que pode acarretar amplas variações de OD. Esses eventos de hipoxia podem acontecer em ciclos diários e por diversos fatores, entre eles a movimentação da maré e a presença de outros organismos, podem durar desde poucos minutos até permanecerem por vários dias (D'Avanzo e Kremer, 1994; Tyler *et al.* 2009).

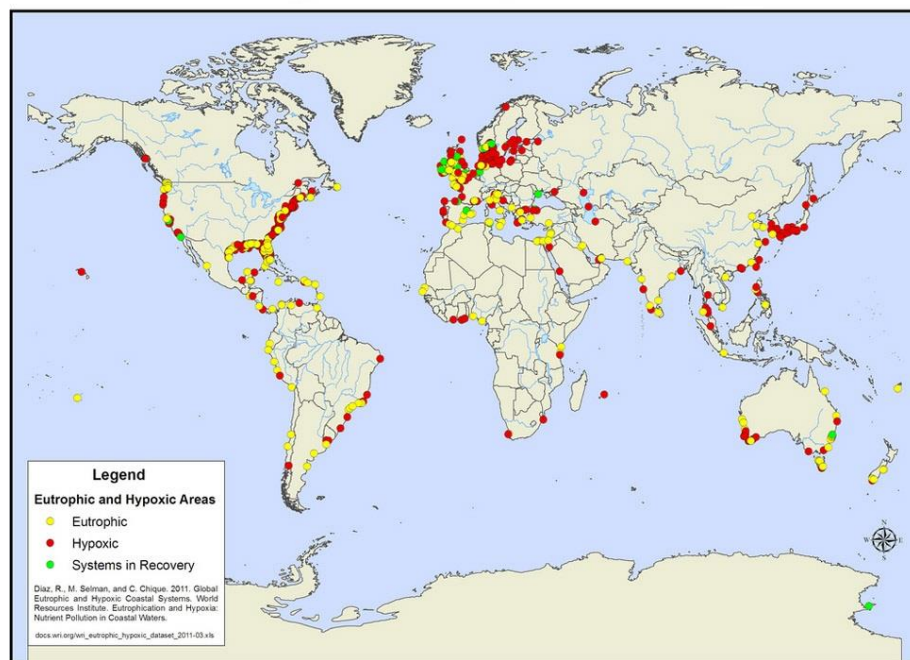


Figura 1. Mapa mundial apontando regiões eutrofizadas (pontos amarelos), hipóxicas (pontos vermelhos) e sistemas em recuperação (pontos verdes) (Diaz *et al.*, 2011).

Para sobreviverem a baixa disponibilidade de oxigênio no meio, diversos animais possuem uma série de adaptações morfológicas, fisiológicas e comportamentais que permitem a sobrevivências nestes locais. Existe uma grande variedade de mecanismos bioquímicos e fisiológicos acionados pelos animais frente a hipóxia, que variam em função da intensidade de hipóxia, do tempo de exposição e da espécie. As respostas mais conhecidas incluem principalmente alteração na circulação, aumento da afinidade do pigmento respiratório pelo oxigênio, ativação do metabolismo anaeróbico e depressão metabólica (Miranda, 1994; deFur *et al.*, 1988; Henry, 1994; Martinez *et al.*

2006; Gilmour e Perry 2007; Sloman *et al.*, 2008; Wells 2009; Richards 2009). Entretanto, apesar da existência dessas respostas muitos animais quando são submetidos a condições hipóxicas podem sofrer danos teciduais oriundos da baixa disponibilidade de energia. Um dos primeiros danos visualizados normalmente nos animais é a perda da capacidade de regulação iônica da célula através dos transportadores de membrana, que leva a alteração do volume celular (Hochachka, 1988).

Além desses problemas gerados pela falta de oxigênio, o período de retorno do oxigênio após a hipóxia, a reoxigenação, pode ser também crítico para os animais. Apesar de estudos recentes indicarem que as espécies reativas de oxigênio (ROS) também podem ser formadas na hipóxia (Clanton *et al.*, 2007), a maior parte das ROS são formadas no período de reoxigenação (Garcia *et al.*, 1996). Na mitocôndria é onde ocorre quase todo o processo de geração de energia como processo de fosforilação oxidativa e a cadeia transportadora de elétrons. Na mitocôndria também é o local onde a maior parte das ROS são formadas, não só em condições de estresse, mas também em condições normais (Storey, 1996; Hermes-Lima e Zenteno-Savin, 2002). As ROS são potencialmente perigosas ao interagirem com proteínas, glicídios, ácidos nucleicos e lipídeos, presentes nas diversas estruturas celulares (Ellis, 2007). A reação das ROS com ácidos graxos poliinsaturados presentes nos fosfolipídios da membrana inicia um processo em cadeia que levam a lipoperoxidação (LPO) alterando a fluidez da membrana (Catalã, 2009). Por estarem constantemente expostos a ambientes hipóxicos e devido aos danos que as ROS podem causar, os animais possuem um sistema de defesa antioxidante (SDA) para tentar prevenir, diminuir ou reparar esses danos (Storey, 1996; Dröge, 2002). O SDA é dividido em enzimáticos e não-enzimáticos, tendo como exemplo para os enzimáticos a catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione reductase (GR) e a glutathione-S-transferase



(GST) e para os não-enzimáticos o ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -carotenos e glutatona (Fig. 2) (Storey, 1996; Dröge, 2002). Quando ocorre um aumento excessivo de ROS como, por exemplo, durante processos de hipóxia e reoxigenação ocorre um desbalanço entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de ROS gerando danos oxidativos.

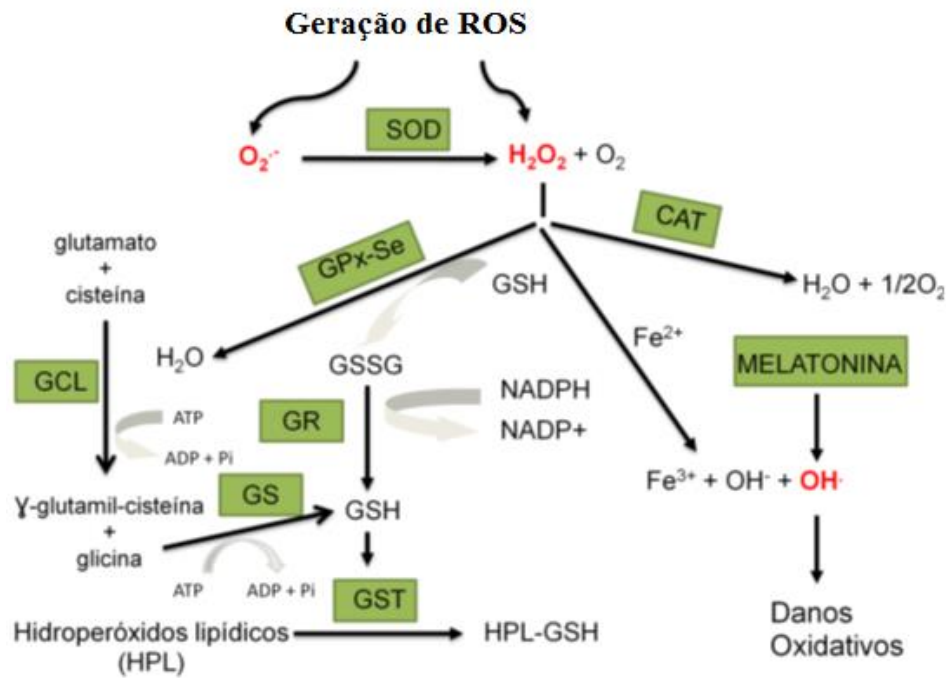


Figura 2. Esquema indicando a geração de espécies reativas de oxigênio e a atuação de diversas moléculas do sistema de defesa antioxidante (Geihs, 2013b).

Como comentado anteriormente, além de possuírem mecanismos fisiológicos e bioquímicos, que permitem a esses animais sobreviverem a hipóxia ambiental, muitos animais possuem também respostas comportamentais. A resposta mais comum para animais que possuem capacidade de deslocamento é a movimentação para áreas mais oxigenadas, denominada de reposta de fuga, a fim de evitar ou diminuir os danos causados por esses ambientes hipóxicos (Breitburg, 1992; Bell e Eggleston, 2005; Tyler e Targett, 2007). Entretanto estas respostas podem desaparecer em situações mais crônicas. Por exemplo, em condição de hipóxia, o siri azul *Callinectes sapidus* tende a apresentar inicialmente uma resposta comportamental aumentando a atividade

locomotora a fim de tentar fugir desta situação. Após esse primeiro estímulo de fuga ele se torna, com o passar do tempo de exposição, menos ativo, diminuindo a movimentação cada vez mais. Quando exposto a hipóxia crônica esta espécie tenta ainda se enterrar no sedimento para poder diminuir o metabolismo e diminuir o risco de predação (Lowery e Tate, 1986; deFur *et al.*, 1990).

Adicionalmente várias espécies possuem adaptações que os permitem utilizar tanto o ambiente aquático quanto o terrestre, inclusive algumas são capazes de realizar trocas gasosas nesse ambiente (deFur, 1988; Gray, 1957; Henry, 1994), sendo considerados animais bimodais. Os crustáceos podem apresentar graus variados na capacidade de utilizar o ambiente terrestre, desde animais inframareais que normalmente não ficam expostos ao ar e possuem pouca ou nenhuma capacidade de exposição, passando por animais considerados intermareais ou semi-terrestre que rotineiramente ficam exposto ao ar e conseqüentemente possuem capacidade se manter minutos a várias horas expostos ao ar, até animais considerados supra-mareais ou terrestres que passam a maior parte do seu ciclo de vida expostos ao ar (para revisão ver Hartnoll, 1988). Vários caranguejos semi-terrestres e terrestres para fazerem respiração aérea possuem uma superfície respiratória “alternativa” conhecida como branquiosteguito ou pulmão branquiostegal, localizada no epitélio da câmara branquial, que é capaz de capturar oxigênio do ar atmosférico (Fig. 3) (Diaz e Rodriguez, 1977). O nível de especialização e complexidade desse “pulmão” depende da espécie. Em alguns caranguejos da família Grapsidea, Gecarcinidea, Potamonidea e Sundathelphusidea a câmara branquial possui um grande volume, permitindo uma área respiratória maior (Greenaway e Taylor, 1976; Diaz e Rodriguez, 1977; Taylor e Greenaway, 1979; Maitland, 1990). Outras espécies como *Ocypode spp*, *Brigus latro* e *Pseudothelphusideos* possuem um menor volume na câmara branquial, entretanto,

possuem uma superfície respiratória muito mais elaborada com um nível maior de complexidade, permitindo assim uma maior eficiência de absorção de oxigênio (Diaz e Rodriguez, 1977; Innes *et al.*, 1987; Al-Wassia *et al.*, 1989; Taylor e Taylor, 1992).

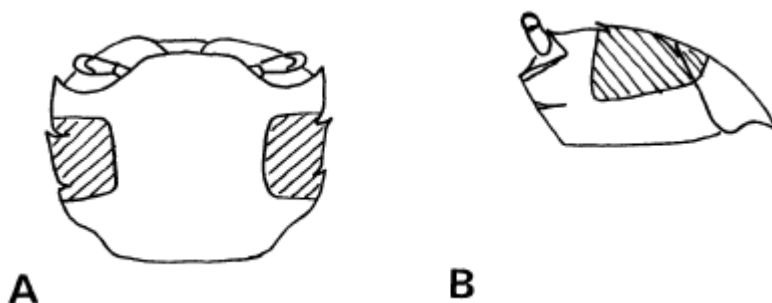


Figura 3. Esquema da parte dorsal (A) e lateral (B) do caranguejo *Neohelice granulata*. Áreas listradas indicam a localização do epitélio respiratório especializado (branquiosteguito) (Halperin *et al.* 2000).

Quando expostos ao ar, esses animais precisam enfrentar alguns problemas como a falta de sustentação das brânquias, podendo causar o colapamento das mesmas e por consequência diminuição da superfície respiratória. Além disso, a perda de água e acúmulo de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e amônia no fluido circulatório também são consequências da exposição ao ar. A fim de evitar o colapamento, as brânquias dessas espécies bimodais são normalmente reduzidas e mais grossas, sendo responsáveis principalmente no transporte iônico e na excreção de nitrogênio. Alguns caranguejos terrestres são tão bem desenvolvidos no sentido de estruturação das brânquias que devido a essas mudanças que permitem a respiração aérea não são capazes de permanecer na água por longos períodos de tempo, pois não mais possuem uma taxa de absorção de oxigênio satisfatória na água (Bliss, 1968; Cameron, 1981; Innes e Taylor, 1986; Greenaway *et al.*, 1988; O'Mahoney e Full, 1989).

Espécies intermareias geralmente são expostas ao ar durante o período de maré baixa, um exemplo dessas espécies são *Eurytium albidigitum* e *Carcinus maenas*, que possuem brânquias espessas, porém não suficientemente reforçadas para permanecerem

funcionais quando expostas ao ar (Gray, 1957; Taylor e Butler, 1978; Compere *et al.*, 1989). *E. albidigitum* fica inativo quando emersos e reduzem drasticamente o consumo de oxigênio (Taylor e Wheatly 1979, Burnett e McMahon, 1987), já *C. maenas* permanece ativo por curtos períodos de tempo durante emersão e mantém as condições necessárias para o influxo de oxigênio na água da câmara branquial através da redução do oxigênio venoso e conseqüentemente uma diferença da pressão de oxigênio transbranquial (deFur *et al.*, 1988; Henry, 1994).

Uma das adaptações encontradas por alguns caranguejos que utilizam o ambiente terrestre é o armazenamento de água na câmara branquial e a recirculação de água pela carapaça. Essas espécies possuem a capacidade de reter um determinado volume de água na câmara branquial quando se deslocam para ambiente terrestre.

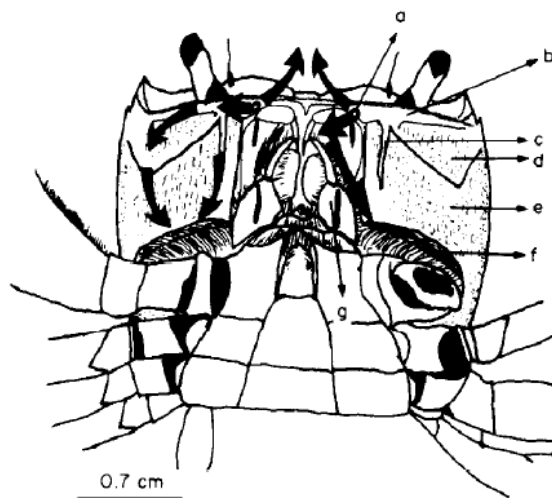


Figura 4. Visão ventral do caranguejo *Neohelice granulata* indicando o processo de recirculação da água. abertura exalante (a), sulco dorsal (b), sulco ventral (c), sulco central (d), pterigostoma (e), abertura Milne-Edward's (f), terceiro maxilípode (g) (Santos et al., 1987).

A água contida na carapaça é expelida através da abertura exalante e vai circular sobre a parte frontal e dorsal da carapaça, logo após retornando para a câmara branquial pela abertura Milne-Edwards (Fig. 4). Esse processo irá permitir que a água seja

reoxigenada, provendo uma maior disponibilidade de oxigênio para o animal, o que permite um aumento na sobrevivência de várias espécies de caranguejos (Santos *et al.*, 1987).

Na cidade de Rio Grande no entorno da laguna Lagoa dos Patos encontram-se 70 Km<sup>2</sup> de marismas (Costa *et al.*, 1997). Essas marismas sofrem variações nos níveis de OD ainda mais drásticas do que os canais estuarinos (D’Incao *et al.* 1992). Essa região serve como áreas de alimentação, berçário, reprodução e moradia por diversos grupos de animais como aves, pequenos roedores, répteis, peixes e crustáceos (Turner, 1976; Mitsch e Gosselink, 1986; Day Jr *et al.*, 1989; Panitz, 1992).

O caranguejo *Neohelice granulata*, (Dana, 1851), anteriormente conhecido como *Chasmagnathus granulata/granulatus* (Sakai *et al.*, 2006), é um crustáceo que habita marismas e zonas estuarinas e é amplamente distribuído ao longo da costa da América do Sul pelo Atlântico (D’Incao *et al.*, 1992). Indivíduos dessa espécie estão presentes em alta densidade nas zonas de supra e médio litoral e cavam buracos no sedimento (D’Incao *et al.*, 1990) onde os níveis de DO são ainda mais baixos (D’Incao *et al.* 1992). Por estarem constantemente expostos a hipóxia *N. granulata* torna-se um bom modelo para o estudo de respostas a essas condições de hipóxia.

Quando exposto ao ar, o caranguejo *N. granulata*, por exemplo, inicia a recirculação da água da câmara branquial sobre a carapaça que pode ser mantida por até aproximadamente 5 horas, sendo que, o consumo de oxigênio durante a primeira meia hora de exposição não apresenta diferenças significativas, porém diminui após uma hora (Santos *et al.*, 1987). Quando retirada a água da câmara branquial durante a exposição ao ar *N. granulata* apresenta um aumento na acumulação de CO<sub>2</sub> (Halperin *et al.*, 2000). Segundo Schmitt e Santos (1993) o tempo médio de saída voluntária ao ambiente aéreo é normalmente entre 1 e 2 min e o tempo letal para 50% da população (LT<sub>50</sub>) para essa

espécie é de 39,4 horas (numa condição de 20°C e umidade relativa do ar 95-100%). Logo após a emersão, *N. granulata* reduz a frequência respiratória para aproximadamente 64% da frequência de batimento dos escafnatitos num período de 15 minutos, e após 4 horas a frequência cai para 49% (Luquet e Ansaldo, 1998). Estudos realizados com *N. granulata* expostos a 8 horas de anoxia seguida de um curto período de reoxigenação foi observado um aumento na lipoperoxidação somente no período de reoxigenação nas brânquias exteriores e posteriores (Oliveira *et al.* 2004). Quando exposto a 4 e 10 horas de hipóxia *N. granulata* não apresenta aumento nos níveis de LPO no músculo locomotor, porém quando submetidos a 30 minutos de reoxigenação apresentam aumento nos níveis de LPO (Geihs *et al.*, 2014). Geihs e colaboradores (2013a) encontraram que o tempo necessário de recuperação após 1 hora de exposição a água hipóxica é de 30 minutos, e quanto maior o tempo de exposição à hipoxia, maior é o tempo de recuperação, sendo necessário pelo menos 12 horas de recuperação quando expostos por 10 horas de hipoxia. Além disso, ocorre um aumento na concentração de ROS após 4 e 10 horas de exposição seguido de 30 minutos de reoxigenação (Geihs *et al.*, 2014). Os estudos realizados com *N. granulata* até o momento foram trabalhos feitos com os animais exclusivamente submerso em água hipóxica ou exposto ao ar, porém nada se sabe sobre as respostas apresentadas por esses animais quando possuem livre acesso a ambos os ambientes, água hipóxica e ar, e se caso a utilização do ambiente aéreo aumenta se isto acarreta em uma diminuição dos danos causados pela hipóxia e reoxigenação.

#### **4. Objetivo geral**

O objetivo desse trabalho é verificar se o caranguejo *N. granulata* utiliza o ambiente aéreo quando exposto a hipóxia aquática severa e se essa estratégia de exposição ao ar é um mecanismo que aumenta a tolerância e resistência a hipoxia e se diminui os danos causados pelo ciclo de hipóxia e reoxigenação.

##### **4.1 Objetivos específicos**

- Verificar se a tolerância e resistência a hipóxia severa aumentam em caranguejos com livre acesso ao ambiente aéreo em relação aos animais mantidos submersos em hipóxia severa.
- Verificar se há aumento na frequência e no tempo de exposição ao ar em caranguejos submetidos a hipóxia severa.
- Verificar se há uma diminuição do nível de peroxidação lipídica no músculo locomotor de caranguejos com livre acesso ao ar em relação a animais mantidos submersos ou expostos a hipóxia seguidos por período de recuperação.

## 5. Artigo

Preference to air exposition of an estuarine crab when exposed to  
hypoxic water

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



Preference to air exposition of an estuarine crab when exposed to hypoxic water

Tábata Martins de Lima, Márcio Alberto Geihs, Fábio Everton Maciel, Luiz Eduardo Maia Nery\*.

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

\*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 fax: +55-53-32336850

## **Abstract**

The behavior of air exposition during severe hypoxia by the semi-terrestrial crab *Neohelice granulata* was investigated. In addition, this study also verified whether this behavior helps mitigate possible oxidative damage, as lipoperoxidation, caused by hypoxia and reoxygenation cycles. The lethal time for 50% of crabs submitted to aquaria with severe hypoxia ( $0.5\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) with free access to the air was compared with crab submitted to severe hypoxia without access to the air. For behavioural analysis the crabs were exposed to an aquaria divided into three zones (water, intermediate, land) for 270 minutes and its time of permanency in each zone was verified. Damages of lipidperoxidation (LPO) in the muscle of walking legs were verified in 4 different experimental conditions (normoxic water with free access to air, hypoxic water without access to air, Hypoxic water following normoxic water and hypoxic water with free access to air). When exposed to hypoxic water *N. granulata* spend significantly more time in the land zone, about 135 min, whereas control animals exposed to normoxic water spent more time under water, about 187 min. By doing this *N. granulata* was able to obtain 100% of survival rate when exposed to severe hypoxia. However, *N. granulata* still needs to go back to water after periods of exposure to air (around 14 min) causing a sequence of small events of hypoxia/reoxygenation. But, despite increasing the survival rate, the use of aerial zone when exposed to hypoxia does not decrease lipidperoxidation damage caused by hypoxia and reoxygenation cycle suffered by these animals.

**Key-words:** Aerial exposition, Crab, Hypoxia, Hypoxia/Reoxygenation, Lipidperoxidation

## Introduction

Oxygen is essential for many organisms due to its importance in energy production. The low energy production due to low oxygen availability may cause alterations in ionic transport and protein synthesis (Richards, 2009), which can be harmful for the cell interfering in its maintenance. Decrease of oxygen in an environment may lead to serious consequences to the organisms, such as biochemical damages, change in population distribution patterns, and death. In the aquatic environment this challenge is bigger because water contains 33 times less oxygen than air (Jones, 1972). The aquatic environment is also subject to greater variation in dissolved oxygen (DO) (Randall *et al.*, 2000), and the quantity of areas with low oxygen concentrations has increased in the past years, especially in coastal and estuarines zone (Diaz and Rosenberg, 1995).

In order to survive in low oxygen concentration habitats, many animals possess a number of morphological, physiological and behavioral adaptations. Some vertebrate are good resistant to low oxygen concentration. There are several fish species that are good resistants to low concentration of oxygen in the water, as example, cyprinid species, such as *Carassius auratus* and *Carassius carassiu* (Lushchak *et al.*, 2001), sculpin species as *Oligocottus maculosus*, *Oligocottus snyderi* and *Chaetopsylla globiceps* (Richards, 2011). In crustaceans, the range of lethal concentration is large, but the crustacean group in general one of the less hypoxic tolerant groups when compared to fishes and mollusks (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008).

The biochemical and physiological responses most common for fishes and crustaceans facing hypoxic conditions are decrease in locomotor activity and cardiac frequency, rise in levels of a respiratory pigment with higher affinity for oxygen, activation of anaerobic metabolism and in more extreme cases, metabolic depression (deFur, 1988; Miranda, 1994; Martinez *et al.*, 2006; Gilmour and Perry 2007; Richards 2009; Wells 2009). Besides energetic problems that may occur when animals are exposed to hypoxia, the period of reoxygenation, can also be dangerous since in this period the generation of reactive oxygen species (ROS) is higher (Halliwell and Gutteridge, 1999). ROS are potentially dangerous if they interact with proteins, carbohydrates, nucleic acids and lipids, present in different cellular structures (Ellis, 2007).

The most common behavioral response of mobile animals in hypoxic conditions, is moving to more oxygenated areas in order to prevent or reduce damage caused by these hypoxic environments (Breitburg, 1992; Bell and Eggleston, 2005; Tyler and Targett, 2007). This behaviour is also seen in crustaceans, for example, the blue crab *Callinectes sapidus* tend to initially increase activity to try to escape from hypoxia, following which they decrease their activity becoming increasingly less active over time. When exposed to chronic hypoxia these individuals try to bury themselves in the sediment in order to decrease their metabolism and reduce the risk of predation (Lowery and Tate, 1986; deFur *et al.*, 1990). Another common behavior in some animals when facing hypoxia is the air exposition. Nowadays, 450 fish species are known to have ability to air breathing (Nelson, 2014). In similar way, certain species of crustaceans are able to perform gas exchange in both, aquatic and terrestrial environments (deFur, 1988, Gray 1957; Henry, 1994). This ability can be very useful when these animals are exposed to hypoxia, however this process may impose cycles of hypoxia and reoxygenation. These cycles may cause problems to these animals if they are too long. In this sense, bimodal animals need to possess adaptations to face the challenges presented not only by aerial environment, as desiccation, release of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and ammonia (NH<sub>3</sub>), but also by the cycle of hypoxia and reoxygenation, as ROS generation.

The semi-terrestrial crab *N. granulata*, is a crustacean that inhabit salt marshes and estuarine areas and is widely distributed along the Atlantic coast of South America (D'Incao *et al.*, 1992). Individuals of this species are present in areas that suffer daily changes in DO and dig holes in the sediment (D'Incao *et al.*, 1990) where DO levels are even lower, can reach complete anoxia (D'Incao *et al.* 1992). The lethal concentration of oxygen in the water for 50% of the population (LC<sub>50</sub>) is around 2.0 and 2.5 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, and when exposed to severe aquatic hypoxia (0.5 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) the lethal time for 50% of the population (LT<sub>50</sub>) is 14 hours (Geihs *et al.*, 2013). To deal with hypoxic conditions *N. granulata* can also move to the aerial environment. According Schmitt and Santos (1993), the volunteer exposition time to air under normoxic conditions is between 1 and 2 minutes. When exposed *N. granulata* begins recirculate water from the branquial chamber over the carapace and can maintain for about 5 hours (Santos *et al.*, 1987) but the lethal time for 50% of the population (LT<sub>50</sub>) is 39.4 hours of aerial exposition (Schmitt and Santos 1993).

The aquatic hypoxia followed by air exposition may induces cycles of hypoxia and reoxygenation causing damages for the animals. Therefore, the aim of this work was to verify if, despite the problems of air exposition, the crab *Neohelice granulata* uses the aerial environment when exposed to hypoxia in order to increase the survival rates and whether if this helps mitigate possible damage as LPO caused by hypoxia and reoxygenation cycles.

## **Materials and Methods**

### **Animal maintenance**

Adult male crabs of *Neohelice granulata* were captured from salt marshes in Rio Grande – Rio Grande do Sul, Brazil. They were kept in the aquatic holding facility at Universidade Federal do Rio Grande - FURG, under controlled conditions. The crabs were acclimated for at least 15 days before experiments. The animals were maintained in tanks, with free access to air at 20°C, 20‰ salinity, 12L:12D photoperiod, 6.5mg.L<sup>-1</sup> oxygen concentration and were fed *ad libitum* with ground beef three times a week until the day of the experiment.

### **Mortality**

The animals were divided into three groups of 10 animals each. The experiment was repeated 3 times with different animals. In the control group, the individuals were maintained in an aquaria divided in two environments, normoxic water (6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) and land, where the animals could move freely between these environments. In the second group, hypoxia/air exposition the animals were also put in aquaria divided into two environments, hypoxic water and land, again with the option of movement between both environments (Fig. 1). In the third group, the animals were kept only under hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>). The mortality was verified every 2 hours for 96 hours. For all groups, the animals entered in the experimental environment with the oxygen concentration already reached in each condition.

The hypoxia was obtained by bubbling nitrogen gas into the aquaria until the level of oxygen dropped to 0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. The conditions of salinity, photoperiod and temperature were the same as the acclimation period. The oxygen concentration in the

aquaria was continuously monitored with a portable oximeter (DO- 5519, Lutron Electronic Enterprise CO). The results are presented as accumulative percentage.

### Behavior

In the behavior analysis, the animal movements were monitored continually in three zones of aquaria: water, intermediate and land zone (Fig. 1). Animal position was classified as water zone when the individuals were fully submersed, intermediate zone when the animals were half in and half out of water and in the land zone when they were completely out of the water. The crab movements were recorded (Sony DCR-SR68) for 270 minutes in two different conditions. For the control group the animals were submitted to a normoxic water ( $6.0 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) with possibility of free exposition to air, and in the hypoxia/air exposition group the animals were submitted to hypoxic water ( $0.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ), also with possibility of free exposition to air. For all groups, the animals entered in the experimental environment with the oxygen concentration already reached in each condition.

The experiment was conducted with 5 animals per aquaria and each trial was triplicated. The experiments were filmed and the movies were analyzed using two types of variables; total time spent in each zone and time spent in each zone for entrance.

### Lipid peroxidation (LPO)

For the LPO analyses the animals were divided into 4 groups. In the control group, the crabs were maintained in an aquaria divided in two environments, normoxic ( $6 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) water and land, with the animals having the option to move freely between these environments. In the second, hypoxia group, the animals were kept only under hypoxic water ( $0.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ). In the third, hypoxia/reoxygenation group, the animals were kept for 4 hours under hypoxic water ( $0.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) and after this period they were transferred to normoxic water conditions ( $6 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 30 minutes. In the hypoxia/air exposition, the animals were also put in an aquaria divided into two environments, hypoxic water ( $0.5 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ) and land, again with the option of movement between both environments. For all groups, the animals entered in the experimental environment with the oxygen concentration already reached in each condition.

After the exposure, muscle samples were collect from the second pair of pereiopods of each animal. The muscles were frozen ( $-80^\circ\text{C}$ ).

A modified FOX assay was used (Hermes-Lima *et al.*, 1995; Monserrat *et al.*, 2003) for LPO determination. The assay quantifies lipid hydroperoxides, one of the main products of lipoperoxidation. The muscles were weighed, homogenized in cold methanol (4°C) and centrifuged for 10 min, in 4°C at 1,000xg and the supernatant was used in the analysis. FeSO<sub>4</sub> (1mM), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.25M), xylenol orange (1mM), MilliQ water were added and the samples were incubated for 375 min. The absorbance was read at 550nm (Victor 2, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). After cumene hydroperoxide (CHP) was added, another reading was performed. LPO was expressed in nmoles of CHP.g<sup>-1</sup> of wet tissue.

### Statistical analysis

All data is presented as means ± standard error. Mortality data is presented as LT<sub>50</sub> estimated by a nonlinear sigmoid regression equation. Normality and homoscedasticity were checked and when necessary transformed to fulfill the assumptions for parametric analysis. A factorial analysis of variance (ANOVA) was performed for behavior and one-way ANOVA was performed for LPO. Both followed by Newman-Keuls *posthoc* test.

### Results

In the survival analysis, the control and hypoxia/air exposition groups had no mortality (Fig. 2). However, the animals kept submersed in hypoxic water remained alive for a maximum of 600 minutes (10 hours) before starting to die, after that the death rate began to increase. The lethal time for 50% of the population (LT<sub>50</sub>) was 1668 minutes (27.8 hours) with an upper limit of 1788 minutes (29.8 hours) (95% confidence interval). In the submersed group 100% of mortality was verified in 2040minutes (34 hours) (Fig. 2).

Control groups spent significantly ( $p<0.05$ ) more time under water ( $187.4 \pm 20.2$  min; corresponding 70% of the time) than on land ( $63.0 \pm 19.3$  min; approximately 23% the time) and in the intermediate zone ( $19.6 \pm 4.5$ min; about 7% the time). In contrast, when animals were submitted to hypoxic water with the possibility to move to a normoxic air environment (hypoxia/air exposition), they spent substantially ( $p<0.05$ ) more time in the land zone ( $135.3 \pm 17.7$  min), which corresponding 50% of the total time. The second most used zone for these animals was the intermediate zone ( $87.7 \pm$

16.7 min), spending 33% of the time in this zone. They spent only 17% of the time under water ( $46.9 \pm 8.5$  min), this zone being less used (Fig. 3).

Analysis of time spent in each zone per entry, shows a pattern quite similar to total time analysis. Control animals spent a longer time in water each time that they entered in this environment, with an average of  $20.9 \pm 9.6$  min and upper limits of 41.9 min (95% confidence interval). After this period, the animals usually went to another environment spending on average  $1.3 \pm 0.3$  min in the intermediate zone and  $3.9 \pm 2.2$  min on land. In the hypoxia/air exposition group the animals spent a longer time on land ( $13.9 \pm 3.9$  min with an upper limit of 22.4 min (95% confidence interval), after which they searched for contact with water primarily in intermediate zone ( $4.6 \pm 0.6$  in this zone with upper limit of 6 minutes) and a minimum time ( $1.9 \pm 0.3$  min with upper limit of 2.5 minutes) in the water zone (Fig. 4).

In the LPO analysis, the control ( $1245.8 \pm 249.9$  nmolCHP.g<sup>-1</sup>) and hypoxia ( $1238.9 \pm 123.9$  nmolCHP.g<sup>-1</sup>) groups exhibit a significant ( $p < 0.05$ ) difference on LPO levels from Hypoxia/Reoxygenation ( $2164.1 \pm 297.6$  nmolCHP.g<sup>-1</sup>) and hypoxia/air exposition groups ( $2265.6 \pm 355.3$  nmolCHP.g<sup>-1</sup>) (Fig. 5). The hypoxia/air exposition and Hypoxia/Reoxygenation groups presented a higher level of LPO damages than the other groups, indicating that air exposition does not prevent damages caused by hypoxic water.

## Discussion

It is already known that hypoxic areas have been growing all over the world and the decrease of oxygen can affect in many ways several animal species. Estuarine environments are examples of environments that are exposed to constant fluctuations in oxygen availability. Several crab species live in these place and are exposed to hypoxia. But despite living in this environment with low DO, crustaceans are not very tolerant to this conditions (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008). One of the species that live in estuarine environments and are always exposed to hypoxia is the crab *N. granulata*. For this specie the oxygen LC<sub>50</sub> is around 2.0 and 2.5 mgO<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> (Geihs *et al.*, 2013). One of the strategy found for some coastal species to deal with hypoxic conditions may be the air exposition.



When obligatory exposed to air, *N. granulata* start to die after approximately 17 hours and presented  $LT_{50}$  of 39.5 hours (Schmitt and Santos, 1993). Control animals exposed to normoxic water and air suffered no mortality, whereas the hypoxia/submerge group with similar data to those found by Geihs *et al.* (2013). However, when the animals were exposed to hypoxic water with free access to land zone (hypoxia/air exposition) there were no mortalities. This may indicate that despite the animals do not survive when exposed obligatorily to air or hypoxic water, the survival rates increase when they have free access to both environments. When animals were exposed to hypoxic water with the possibility of moving to an environment with normoxic air, they used this chance to spend a short time under hypoxic conditions. It seems that *N. granulata* use the strategy of air exposition when submitted to hypoxia and by doing this they are capable to raise their survival to 100% in comparison with animals that were kept under hypoxic water.

*N. granulata* spent substantially more time in the land zone to avoid hypoxic water conditions. But animals from this species are not completely prepared to occupy this environment. They have features as thin diffusion barrier (Halperin, 2000) and relatively high gill area (Santos *et al.*, 1987) that difficult aerial exposition. For this reason *N. granulata* carry water inside the branquial chamber when exposed to air and by doing this they are able to perform aquatic gas exchange either under water or exposed to air. In order to reoxygenate the water from the branquial chamber *N. granulata* has the capacity to recirculate the water over the carapace. The animals start this process as soon as they are exposed to air, and can maintain this circulation for about 5 hours (Santos *et al.*, 1987). The water stored inside the branquial chamber is the first but not the only source of oxygen from this species. The crab *N. granulata* is known as a bimodal crab with the ability to breath in both, aquatic and aerial environment. The aerial gas exchange is performed through an "alternative" respiratory surface known as branchiostegal lung. This surface is localized in the epithelium of the gill chamber and is capable of capturing oxygen from atmospheric air (Halperin *et al.*, 2000).

In previous study was found that the volunteer time of exposure to air for *N. granulata* is around 1.9 minutes under normoxic conditions (Schmidt and Santos, 1993), close to the time found in this work of 3.9 min in the control group. In both studies animals spent more time submersed. Under hypoxic water conditions the pattern

of displacement is the opposite than that reported in normoxic conditions. The animals spent a longer time exposed to air, around 14 minutes, but with frequent excursions to intermediate or water zones. In the return to the water *N. granulata* seems to have a preference for the intermediate zone instead of being fully submerged in hypoxic water. One possibility for this zone preference might be due to the proximity of this zone to the aerial environment, since there is a tendency to be closer to the surface where the availability of oxygen is higher. This behavior is already related for other animals, for example, some fishes, as sculpin species, when exposed to hypoxic water also present a behavioral response of aquatic surface respiration and aerial emergence (Richards, 2011). The crab *Carcinus maenas* also it exposes to air straightening their walking legs and raising their body out of water and bubbling (Taylor *et al.* 1973). Another possibility for intermediate zone preference is that in this zone the animals can release CO<sub>2</sub> and ammonia and keep recirculating water over the carapace. The accumulation of CO<sub>2</sub> during air exposition is reported not only for *N. granulata* (Luquet *et al.*, 1998) but also for other crustaceans (Innes and Taylor, 1986; Burnett and McMahon, 1987; deFur *et al.*, 1988).

The changes of zone, from hypoxic water to aerial environment may be exposing the animals to hypoxia cycles. Despite the strategies that *N. granulata* present to aerial exposure there are still damages caused by the cycle of hypoxia reoxygenation. LPO damage occurs mainly in the reoxygenation period. Previous studies demonstrate that during 1, 4 and 10 hours of hypoxia there was no LPO damage, but after 30 minutes of reoxygenation in normoxic water there was an increase in LPO levels, and these levels only returned to normal after 2 hours of reoxygenation (Geihs *et al.*, 2014). In the present work there was no LPO increase for control and hypoxia groups but there was an increase in LPO for the hypoxia/air exposition group that was similar to the increase presented for hypoxia/reoxygenation group. This similarity indicates that despite the free access to both environments, hypoxia/air exposition group still suffers oxidative stress, generating ROS from hypoxia and reoxygenation. The return from land to water probably acts like a series of small events of hypoxia and reoxygenation having the same effect of a bigger event. In this case, reoxygenation caused by air exposition is not enough efficient for *N. granulata* to fully recover from damage caused by hypoxic water. Previous works found that when exposed for 1 hour to severe hypoxia, *N. granulata* need at least 30 minutes under normoxic conditions to recover from the

hypoxic time. When the hypoxia time is 4 hours the recovering time under normoxic conditions is about 6 hours and after 10 hours of exposition to severe hypoxia the necessary time for recovering is 12 hours (Geihs *et al.*, 2013). Apparently the time spent in land zone is not enough to fully recovering of *N. granulata* from hypoxic water. In this study was found that under hypoxic conditions *N. granulata* spend around 14 minutes in land zone with air contact but after this time they need water contact, spending approximately 5 minutes in intermediate zone or around 2 minutes under hypoxic water leading the animal to repeated cycles of hypoxia and reoxygenation. An hypoxia period followed by a reoxygenation period is already know for causing LPO damages to some animal species, one example is a disease known as sleep apnea that affect humans. People with sleep apnea suffer cycles of hypoxia and reoxygenation cycles during sleep period and recent studies have found that apnea may cause lipid peroxidation (Adedayo, 2012).

Besides LPO damages, the cycles of hypoxia and reoxygenation may interfere in animal life in different ways. In fishes it can raise competition, reduces prey abundance and changes in benthic invertebrate assemblages what can interfere in growth rates (Eby and Crowder, 2002; Diaz and Rosenberg, 1995). Cyclic and constant hypoxia also interfere in growth rates of larval *Palaemonetes vulgaris* (Coiro, *et al.*2000). Cyclic hypoxia exposition may also decrease the number of broods that a female of *Palaemonetes pugio* is capable to produce (Brown-Peterson *et al.* 2008). In addition, the crab *Thalamita danae* when exposed to hypoxia cycles alter they feeding pattern (Shin *et al.*, 2005). In normoxic conditions, *T. danae* do not have preference for the size of the prey, but under cyclic hypoxia they select the food, preferring medium mussels than small or large ones.

Apparently the pattern of use of the land is discontinuous intercalated with periods of contact with the water. This entrance and exit of water probably feature small cycles of hypoxia and reoxygenation and when it comes of LPO damages these small cycles act like a big event of hypoxia and reoxygenation increasing LPO damages, but not enough to kill the animal. When facing severe hypoxia *N. granulata* increases the utilization rate of land and by doing this they increase the survival rate in 100%.

## References

- Adedaya, A.M.; Olafiranye, O.; Smith, D.; Hill, A.; Zizi, F.; Brown, C. Jean-Louis, G., 2014. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: evidence and underlying mechanism. *Sleep Breath* 18:13-18.
- Bell, G.W., Eggleston, D.B., 2005. Species-specific avoidance responses by blue crabs and fish to chronic and episodic hypoxia. *Mar. Biol.* 146:761-770.
- Breitburg, D.L., 1992. Episodic hypoxia in Chesapeake Bay: Interacting effects of recruitment, behavior and physical disturbance. *Ecol. Monogr.* 62:525-546
- Brown-Peterson, N.J., Manning, C.E., Patel, V., Denslow, N.D., Brouwer, M., 2008. Effects of cyclic hypoxia on gene expression and reproduction in a grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Biol. Bull.* 214:6-16.
- Burnett, L.E., McMahon, B.R., 1987. Gas exchange; hemolymph acid– base status and the role of branchial water stores during air exposure in three littoral crab species. *Physiol. Zool.* 60(1): 27–36
- Coiro, L.L., Poucher, S.L., Miller, D.C., 2000. Hypoxic effects on growth of *Palaemonetes vulgaris* larvae and other species: Using constant exposure data to estimate cyclic exposure response. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 247: 243-255
- deFur, P.L., Pease A., Siebelink, A., Elfers, S., 1988. Respiratory responses of the blue crabs; *C. sapidus*; to emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 89A:97–101
- deFur, P.L., Mangum, C.P., Reese, J.E., 1990. Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biol. Bull.* 178:46-54.
- Diaz, R.J., Rosenberg, R., 1995. Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 33:245-303.
- Diaz, R., Selman, M., Chique, C., 2011. Global eutrophic and hypoxic coastal systems. World Resource Institute. *Eutrophication and Hypoxia: Nutrient pollution in coastal waters.*
- D'Incao F., Da Silva K.G., Rufino M.L., Da Costa Braga A., 1990. Habito alimentar do caranguejo *C. granulata* Dana 1851 na barra do Rio Grande; R.S. (Decapoda, Grapsidae). *Atlântica (Rio Grande)* 12(2):85–93.
- D'Incao, F., Ruffino, M.L., Dasilva, K.G., Braga, A.D., 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda, Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 179–188.
- Eby, L.A., Crowder, L.B., 2002. Hypoxia-based habitat compression in the Neuse River Estuary: context-dependent shifts in behavioral avoidance thresholds. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59: 952-965.

Ellis, M.E., 2007. Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. *Pharmacology & Therapeutics*. 115, 13 – 24.

Geihs, M.A., Maciel, F.E., Vargas M.A., Cruz, B.P., Nery, L.E.M., 2013. Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 445, 69-78.

Geihs, M.A., Vargas, M.A., Nery, L.E.M., 2014. Damage caused during hypoxia and reoxygenation in the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda Varunidae). *Comp. Biochem. Physiol. A*. 172, 1-9.

Gilmour, K. M., Perry, S. F., 2007. Branchial chemoreceptor regulation of cardiorespiratory function. In *Fish Physiology*, Vol. 25, Sensory Systems Neuroscience (ed. B. Zielinski and T. J. Hara), pp. 97-151. San Diego: Academic Press.

Gray, I.E. 1957. A comparative study of the gill area of crabs. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 112:34–42.

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

Halliwell, B., Gutteridge, J.C.M., 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3th ed. Oxford University Press Inc., N.Y.

Henry, R.P., 1994. Morphological; behavioral; and physiological characterization of bimodal beathing crustaceans. *Am. Zool.* 34:205–15.

Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268, R1386-R1393.

Innes, A.J. and Taylor, E.W., 1986. An analysis of lung function in the Trinidad mountain crab, *Pseudothelphusa garmani*. *J. Physiol.* 373, 43.

Jones, J.D., 1972. *Comparative physiology of respiration*. Edward Arnold, London, UK

Lowery, T.A., Tate, L.G., 1986. Effects of hypoxia on hemolymph lactate and behavior of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun in the laboratory and field. *Comp. Biochem. Physiol. A* 85:689-692.

Luquet, C.M., Cervino, C.O., Ansaldo, M., Carrera Pereyra, V., Kocmur, S., Dezi, R.E., 1998. Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. *Comp. Biochem. Physiol.* 121A, 385–393.

Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A, Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and oxidant defenses in gold fish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280, R100-R107.

Martinez, M.L., Landry, C., Boehm, R., Manning, S., Cheek, A.O., Rees, B.B. 2006. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *J. Exp. Biol.* 209: 3851-3861.

Miranda, R.B., 1994. Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a osmorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Master Thesis. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil. 171 pp

Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Pinho, G.L.L., Vinagre, T.M., Faleiros, M., alciati, J.C., Bianchini, A., 2003. Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45,177–183.

Nelson, J. A., 2014. Breaking wind to survive: fishes that breathe air with their gut. *Journal of Fish Biology* 84, 554–576.

Peppard, P.E., Young, T., Palta, M., Skatrud, J., 2000. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med.* 342:1378 –1384.

Randall D., Burggren W., French K., 2000. *Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações*. 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Richards. J.G., 2011. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 214, 191-199.

Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2009. Hypoxia In *Fish Physiology*, Vol. 27 (ed. A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 528. San Diego: Academic Press.

Santos, E.A., Baldiseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., 1987. Respiratory mechanism and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A, 21–25.

Schmitt, A.S.C. and Santos, E.A., 1993. Behavior and haemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana,1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A2 p. 337-342.

Shin, P.K.S.; Cheung, P.H.; Yang, F.Y.; Cheung, S.G., 2005. Intermittent exposure to reduced oxygen levels affects prey size selection and consumption in swimming crab *Thalamita danae* Stimpson. *Marine Pollution Bulletin* 51: 1003-1009.

Taylor, H.H., Taylor, E.W. 1992. Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates—Decapod Crustacea*, vol. 10. Wiley–Liss, New York, pp. 203–293.

Taylor, E.W., Butler, P.J., Sherlock, P.J., 1973. The respiratory and cardiovascular changes associated with the emersion response of *Carcinus maenas* (L.) during environmental hypoxia, at three different temperatures. *J. Comp. Physiol.* 86:95-115.

Tyler, R.M., Targett, T.E., 2007. Juvenile weakfish *Cynoscion regalis* distribution in relation to diel-cycling dissolved oxygen in an estuarine tributary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333:257-269.

Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *PNAS*.105, 15452-15457

Wells, R.M.G., 2009. Blood-gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia. In *Hypoxia* (ed. J. G. Richards, A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 255-299. San Diego: Elsevier.

Young, T., Palta. M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., Badr, S., 1993. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med.* 328:1230 –1235.

## Captions to Figures

**Figure 1.** Aquaria scheme where frequency of air exposure analysis occurred. The land zone was considered when the animal was completely exposed to air with no contact with water; intermediate zone was considered when the animal cephalothorax was in contact with both water and land zones; and water zone was considered when the animal was fully submersed.

**Figure 2.** *Neohelice granulata* mortality rate when exposed to different conditions. Asterisk – crabs exposed to normoxic water (6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air (normoxia/air exposition). Circle – crabs kept submerge under hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) (hypoxia/submerge). Triangle – crabs exposed to hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to normoxic air (hypoxia/air exposition). Only hypoxia/submerge group presented mortality. Data presented as mean ± standard error of three experiments with 10 animals each.

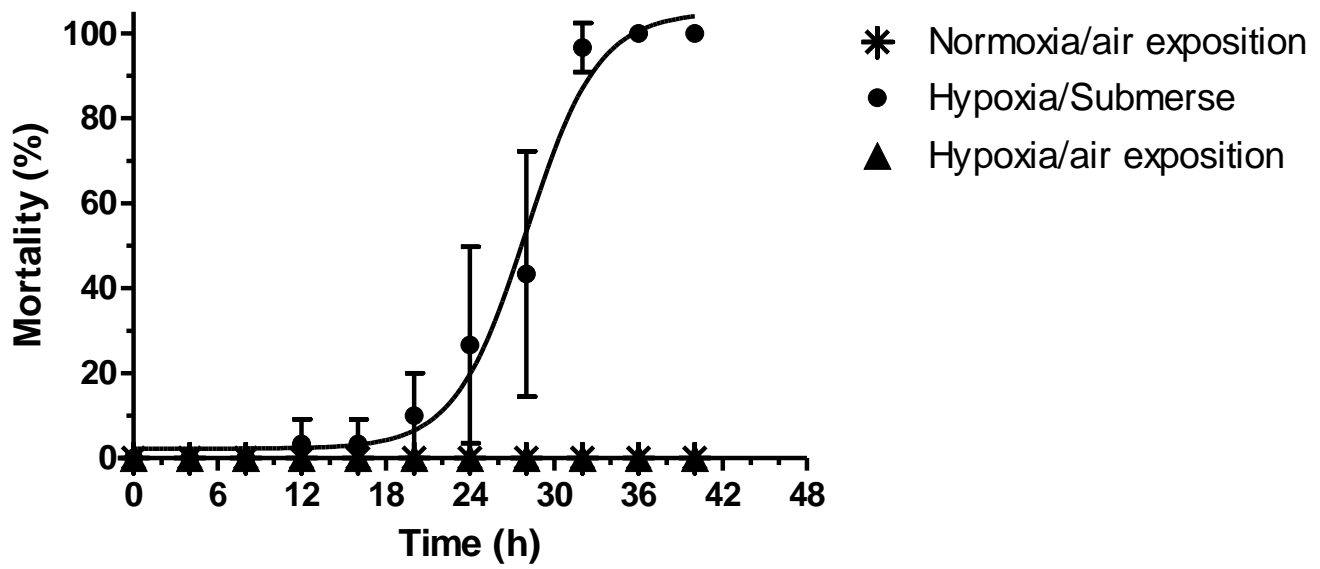
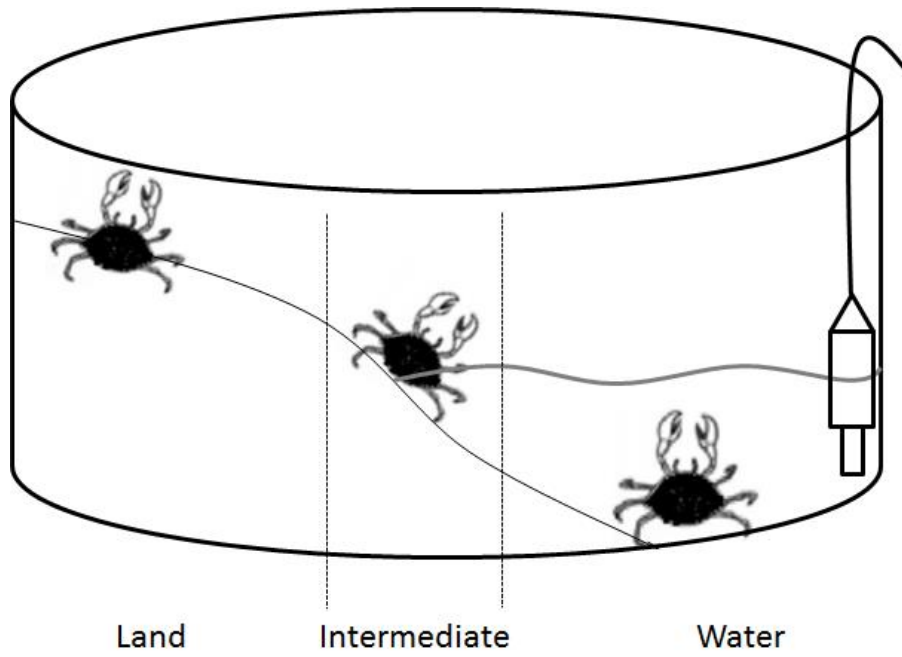
**Figure 3.** Total time of *Neohelice granulata* permanency in each zone during 4h30 of exposition. The data were presented as mean ± standard error (n=5) in triplicate. White columns represent control animals exposed to normoxic water (6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air. Gray columns represent animals submitted to hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air. Different letters represents significant differences (p<0.05) between the groups.

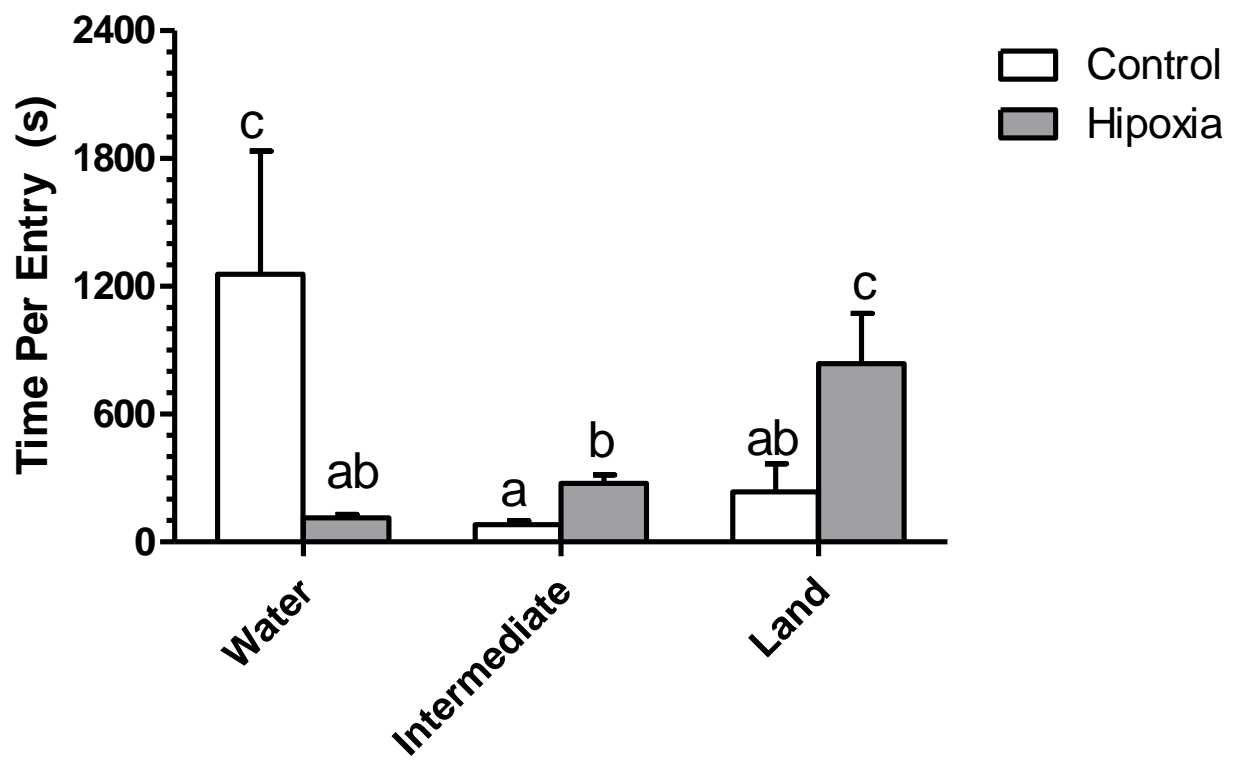
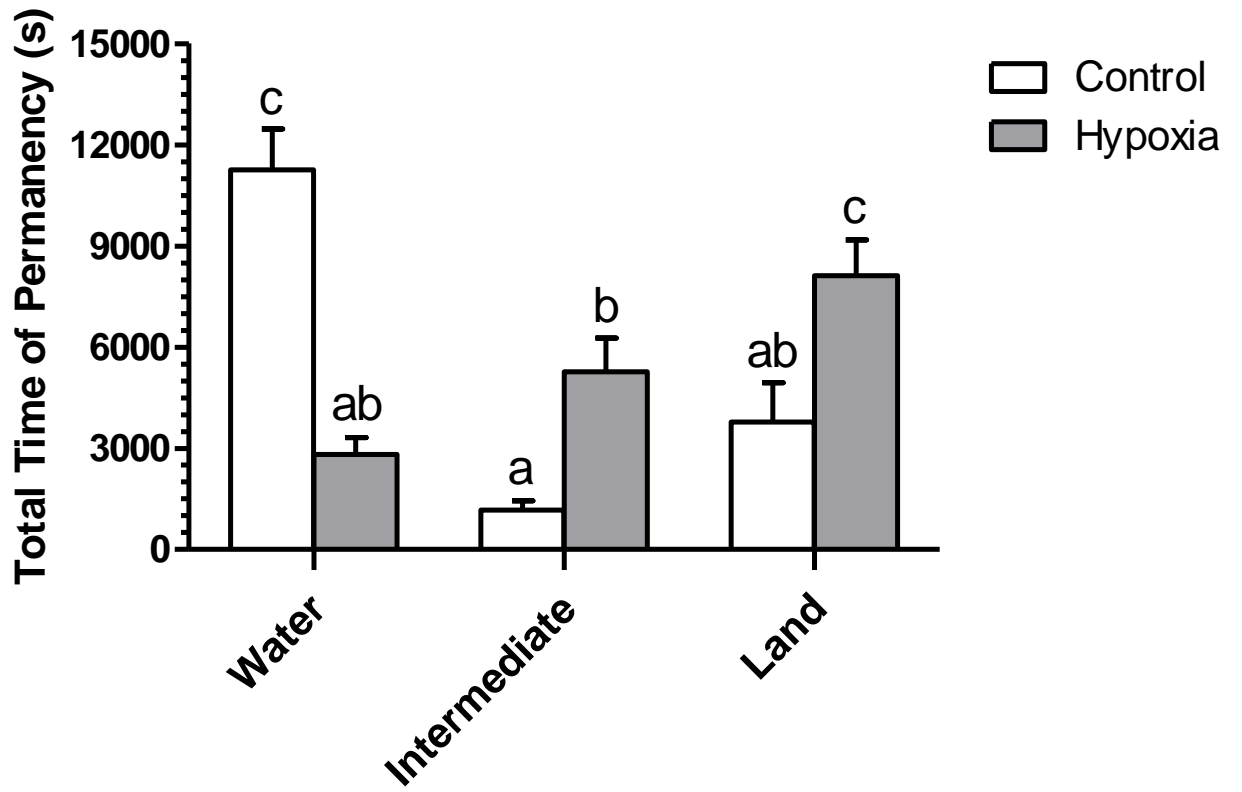
**Figure 4.** Permanency time per entrance of *Neohelice granulata* in each zone. The data were presented as mean ± standard error (n=5) in triplicate. White columns represent control animals exposed to normoxic water (6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air. Gray columns represent animals submitted to hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air. Different letters represents significant differences (p<0.05) between the groups.

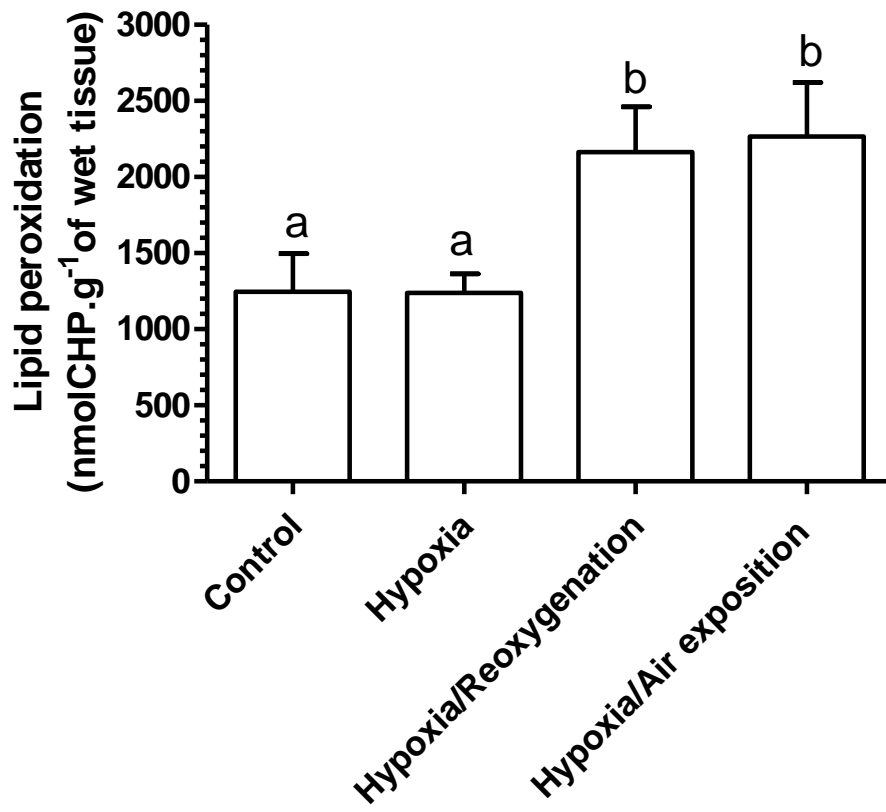
**Figure 5.** Lipid peroxidation levels in the crab *Neohelice granulata* muscle. In control group the animals were maintained in normoxic water (6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air. In hypoxia group they were kept only submersed into hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>). Hypoxia/Reoxygenation animals were kept submersed for 4 hours into hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) and after submitted to 30 minutes of reoxygenation in normoxic conditions (6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>). In the group Hypoxia/Air exposition, the animals were maintained in a aquaria with hypoxic water (0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) with free access to air. Different letters represents significant differences (p<0.05) between the groups.



## Figures







## 6. Discussão Geral e Perspectivas

Estuários são regiões que abrigam uma grande variedade de espécies e sofrem com constantes variações na disponibilidade de oxigênio no meio. Entre as espécies que habitam regiões estuarinas podemos citar os crustáceos, que apesar de estarem constantemente expostos a essas regiões não são, em geral, muito tolerantes a condições hipóxicas (Vaquer-Sunyer e Duarte, 2008). Uma das estratégias utilizadas para algumas espécies costeiras para lidar com condições hipóxicas pode ser a exposição ao ambiente aéreo. Quando o caranguejo semi-terrestre *Neohelice granulata* foi mantido submerso em hipóxia severa (0,5mlO<sub>2</sub>/L), apresentou 100 % de mortalidade em 36 horas, dados estes similares aos encontrados por Geihs e colaboradores (2013a) para esta mesma espécie. Entretanto quando mantido em hipóxia severa, mas com livre acesso a terra não houve mortalidade. Quando analisado a utilização dos ambiente pelos animais, pudemos constatar que quando exposto à condição normoxica, *N. granulata* passa significativamente mais tempo na água (~188 minutos), enquanto que quando exposto à hipóxia severa passam um tempo maior na terra a fim, provavelmente, de evitar as condições hipóxicas. Porém, apesar de animais expostos a hipóxia severa passarem maior parte do tempo de exposição na terra, após, em média 14 minutos de exposição, eles retornam ao ambiente intermediário ou aquático, provavelmente para ter acesso a água. Esse processo de exposição ao ar intercalado com a utilização do ambiente aquático pode caracterizar diversos eventos de hipóxia e reoxigenação.

Apesar das estratégias que *N. granulata* apresenta de exposição aérea para aumentar a sobrevivência, danos ainda ocorrem. No presente estudo os grupos controle e hipóxia não apresentaram aumento na LPO, mas os grupos hipóxia/exposição ao ar e hipóxia/reoxigenação apresentaram um aumento significativo nos níveis de danos lipídicos. Esse aumento nos dois grupos pode indicar que apesar do livre acesso a

ambos os ambientes (água hipóxica e ar) esse grupo ainda sofre com estresse oxidativo, gerando ROS possivelmente devido à constante movimentação entre a água hipóxica e o ambiente aéreo, acarretando ciclos de hipóxia e reoxigenação. Esses ciclos de entrada e saída da água hipóxica podem agir como uma serie de pequenos eventos de hipóxia e reoxigenação acumulados, apresentando provavelmente o mesmo efeito de um único evento de maior intensidade de hipóxia. Aparentemente o tempo exposto ao ar no ambiente terrestre não é suficiente para total recuperação de *N. granulata* quando submetido a hipóxia.

Aparentemente quando expostos ao ar, *N. granulata* utiliza mais o ambiente terrestre, porém, intercalando os períodos em terra com rápidas incursões a água ou ao ambiente intermediário. E apesar desse padrão de utilização aumentar a sobrevivência dos animais quando expostos a água hipóxica ele não diminui os danos de lipoperoxidação causados por essa exposição.

A partir dessa conclusão uma série de novas questões surgem. Primeiramente, levando em consideração o aumento dos níveis de LPO apresentado por *N. granulata*, frente a condições de hipóxia com livre acesso ao ar, seria interessante verificar se o dano gerado é em decorrência de um aumento da geração de ROS. Outra questão é se quando submetido a essas condições *N. granulata* ativa o metabolismo anaeróbico mesmo com possibilidade de exposição ao ar. Ainda relacionado a danos, seria interessante verificar se os danos oxidativos persistem com o passar do tempo ou se diminuem. O presente estudo foi realizado com a diminuição drástica da concentração de oxigênio na água. Neste sentido, seria interessante mais estudos com outras formas de exposição como uma diminuição mais gradual dos níveis de oxigênio ou até uma pré-exposição a níveis mais brandos antes de uma exposição severa, a fim de avaliar se os danos diminuem.

## **BIBLIOGRAFIA DA INTRODUÇÃO GERAL E CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVA**

Al-Wassia, A.H., Innes, A.J., Whiteley, N.M., Taylor, E.W. (1989). Aerial and aquatic respiration in the ghost crab *Ocypode saratan*. I. Fine structure of respiratory surfaces, their ventilation and perfusion; oxygen consumption and carbon dioxide production. *Comp. Biochem. Physiol.* 94A, 755–764.

Bell, G.W. e Eggleston, D.B. (2005). Species-specific avoidance responses by blue crabs and fish to chronic and episodic hypoxia. *Mar. Biol.* 146:761-770.

Bliss, D.E. (1968). Transition from water to land in decapod crustaceans. *Am. Zool.* 8, 355–392.

Breitburg, D.L. (1992). Episodic hypoxia in Chesapeake Bay: Interacting effects of recruitment, behavior and physical disturbance. *Ecol. Monogr.* 62:525-546.

Burnett, L.E. e McMahon, B.R. (1987). Gas exchange; hemolymph acid– base status and the role of branchial water stores during air exposure in three littoral crab species. *Physiol. Zool.* 60(1): 27–36.

Cameron, J.N., (1981). Brief introduction to the land crabs of the Palau Islands: stages in the transition to air breathing. *J. Exp. Zool.* 218, 1–5.

Catalã, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxylalkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* 157, 1-11.

Clanton, T.L. (2007). Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 102: 2379- 238.

Compere, P.H., Wanson, S., Pequeux, R., Gilles, R. e Goffinet, G. (1989). Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus maenas* in relation to the external salinity. *Tissue Cell* 21 (2), 299–318.

Costa, C.S.B., Oliveira, C.P.L., Seeliger, U. (1997). Distribuição, funções e valores das marismas e pradarias submersas no estuário da Lagoa dos Patos (RS) Brasil. *Atlântica*, Rio Grande, v. 19, p. 67-85.

Day Jr, J. W. *et al.* (1989). *Estuarine Ecology*. New York: John Wiley & Sons. 558 p.

D'Avanzo, C. e Kremer J.N., (1994). Diel oxygen dynamics and anoxic events in an eutrophic estuary of Waquoit Bay, Massachusetts. *Estuaries* 17:131-139.

D'Incao F., Da Silva K.G., Rufino M.L., Da Costa Braga A. (1990). Habito alimentar do caranguejo *C. granulata* Dana 1851 na barra do Rio Grande; R.S. (Decapoda, Grapsidae). *Atlântica (Rio Grande)* 12(2):85-93.

D'Incao, F., Ruffino, M.L., Dasilva, K.G., Braga, A.D. (1992). Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda, Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 161: 179-188.

deFur, P.L. (1988). Systemic respiratory adaptations to air exposure in intertidal decapod crustaceans. *Am. Zool.* 28:115-24.

deFur, P.L., Mangum, C.P. e Reese, J.E., (1990). Respiratory responses of the blue crab *Callinectes sapidus* to long-term hypoxia. *Biol. Bull.* 178:46-54.

deFur, P.L., Pease A., Siebelink, A., Elfers, S. (1988). Respiratory responses of the blue crabs; *C. sapidus*; to emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 89A:97-101

Diaz, H. e Rodriguez, G. (1977). The branchial chamber in terrestrial crabs: a comparative study. *Biol. Bull.* 153, 485-504.

Diaz, R.J. e Rosenberg, R., (1995). Marine benthic hypoxia: a review of its ecological effects and the behavioral responses of benthic macrofauna. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 33:245-303.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47 - 95.

Ellis, M.E. (2007). Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. *Pharmacology & Therapeutics*. 115, 13 – 24.

Gade, G. (1983). Energy metabolism of arthropods and mollusks during environmental and functional anaerobiosis. *J Exp Zool*, v. 228, p. 415-429.

Garcia, A.M., Vieira J.P., Bemvenuti C.E. e Geraldi R.M. (1996). Abundância e diversidade da assembléia de crustáceos decapodes dentro e fora de uma pradaria de *Ruppia maritima L.*, no estuário da Lagoa dos Patos (RS-Brasil). *Nauplius*, Rio Grande, 4:113-128.

Geihs, M.A., Maciel, F.E., Vargas M.A., Cruz, B.P., Nery, L.E.M. (2013a). Effects of hypoxia and reoxygenation on the energetic metabolism of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 2013. 445, 69-78.

Geihs, M.A., (2013b). Efeito da hipóxia e reoxigenação no músculo locomotor do caranguejo *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). Universidade Federal do Rio Grande. Pp 172.

Geihs, M.A., Vargas, M.A., Nery, L.E.M. (2014). Damage caused during hypoxia and reoxygenation in the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda Varunidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 2014. 172, 1-9.

Gray, I.E. (1957). A comparative study of the gill area of crabs. *Biol. Bull. (Woods Hole)* 112:34–42.

Gray, J., Wu, R.S.S. e Or. Y.Y., (2002). Effects of hypoxia and organic enrichment on the coastal marine environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238:249-279).

Greenaway, P. e Taylor, H.H. (1976). Aerial gas exchange in Australian arid-zone crab. *Parathelphusa transversa*. *Nature* 262, 711–713.

Greenaway, P., Morris, S., McMahon, B.R. (1988). Adaptations to a terrestrial existence by the robber crab, *Birgus latro*: II. In vivo respiratory gas exchange and transport. *J. Exp. Biol.* 140, 493–509.



Gilmour, K. M. e Perry, S. F., (2007). Branchial chemoreceptor regulation of cardiorespiratory function. In Fish Physiology, Vol. 25, Sensory Systems Neuroscience (ed. B. Zielinski and T. J. Hara), pp. 97-151. San Diego: Academic Press.

Gonçalves, A.A.(1983). Adaptações metabólicas do caranguejo *Chasmagnathus granulatus* Dana:1851 (Crustacea: Decapoda: Grapsidae) durante anoxia ambiental. Monografia (Graduação em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.

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

Henry, R.P. (1994). Morphological; behavioral; and physiological characterization of bimodal beathing crustaceans. Am. Zool. 34:205–15.

Hermes-Lima, M., Storey, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. Am. J. Physiol. 268, R1386-R1393.

Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T., (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. Comp. Biochem. Physiol. C. 133, 537-556.

Hochachka, P.W. (1988). Metabolic suppression and oxygen availability. Can. J. Zool. 66:152-158.

Innes, A.J., Taylor, E.W. (1986). An analysis of lung function in the Trinidad mountain crab, *Pseudothelphusa garmani*. J. Physiol. 373, 43.

Innes, A.J., Taylor, E.W., El Haj, A.J. (1987). Air breathing in the trinidad mountain crab: a quantum leap in the evolution of the invertebrate lung? Comp. Biochem. Physiol. 87A, 1–8.

Jones, J.D. (1972). Comparative physiology of respiration. Edward Arnold, London, UK.

Loesch, H. (1960). Sporadic mass shoreward migrations of demersal fish and crustaceans in Mobile Bay, Alabama. Ecology 41:292-298.

Lowery, T.A. e Tate, L.G., (1986). Effects of hypoxia on hemolymph lactate and behavior of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun in the laboratory and field. *Comp. Biochem. Physiol. A* 85:689-692.

Luquet, C.M.; Ansaldo, M., (1997). Acid-base balance and ionic regulation during emersion in the estuarine intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 117A (3), 407–410.

Luquet, C.M.; Cervino, C.O.; Ansaldo, M.; Carrera Pereyra, V.; Kocmur, S.; Dezi, R.E., (1998). Physiological response to emersion in the amphibious crab *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda Grapsidae): biochemical and ventilatory adaptations. *Comp. Biochem. Physiol.* 121A, 385–393.

Maitland, D.P. (1990). Aerial respiration in the semaphore crab, *Heloecius cordiformis*, with or without branchial water. *Comp. Biochem. Physiol.* 95A, 267–274.

Martinez, M.L., Landry, C., Boehm, R., Manning, S., Cheek, A.O., Rees, B.B. (2006). Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *J. Exp. Biol.* 209: 3851-3861.

Miranda, R.B., (1994). Efeitos da temperatura e da salinidade sobre a tolerância e a osmorregulação de *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851. Master Thesis. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil. 171 pp

Mitsch, W.J. e Gosselink, J.G. (1986). *Wetlands*. New York: Van Nostrand Reinhold. p. 173-206.

Monserrat, J.M., Geracitano, L.A., Pinho, G.L.L., Vinagre, T.M., Faleiros, M., alciati, J.C., Bianchini, A., (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates tissues using the Fe(III) xylenol orange complex formation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 45,177–183.

Oliveira, G.T. e da Silva, R.S.M. (2000). Hepatopancreas gluconeogenesis during hyposmotic stress in *Chasmagnathus granulata* crabs maintained on high-protein or carbohydrate-rich diets. *Comp Biochem. Physiol*, v. 127B p. 375-381.

Oliveira, U.O.; Araújo, A.S.R.; Belló-Klein, A.; Silva, R.S.M.; Kucharski, L.C. (2004). Effects of environmental anoxia and different periods of reoxygenation on oxidative balance in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140B p.51-57.

O'Mahoney, P.M. e Full, R.J. (1989). Respiration of crabs in air and water. *Comp. Biochem. Physiol.* 79A, 275–282.

Panitz, C.M.N. (1992). Ecological aspects of a saltmarsh ecosystem in Santa Catarina Island (Brazil). In: SEELIGER, U. (Ed.). *Coastal Plant Communities of Latin America*. New York: Academic Press. p. 213-230.

Paerl, H.W.; Pinckney, J.L.; Fear, J.M. e Peierls, B.L. (1998). Ecosystem responses to internal and watershed organic matter loading: consequences for hypoxia in the eutrophying Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Ma. Ecol. Prog. Ser.* 166:17-25.

Randall D., Burggren W., French K. (2000). *Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações*. 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Richards. J.G. (2011). Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *J. Exp. Biol.* 214, 191-199.

Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J., (2009). Hypoxia In *Fish Physiology*, Vol. 27 (ed. A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 528. San Diego: Academic Press.

Santos, E.A., Baldiseroto, B., Bianchini, A., Colares, E.P., Nery, L.E.M., Manzoni, G.C., (1987). Respiratory mechanism and metabolic adaptations of an intertidal crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* 88A, 21–25.

Sakai, K., Türkay, M., Yang, S.L (2006). Revision of the *Helice/Chasmagnathus* complex (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Abh. Senckenberg. Naturforsch. Ges.* 565, 1–76.

Schmitt, A.S.C.; Santos, E.A. (1993). Behavior and haemolymphatic ionic composition of the intertidal crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Crustacea: Decapoda) during emersion. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A2 p. 337-342.

Sloman, K.A., Mandic, M., Todgham, A.E., Fangue, N.A., Subert, P., Richards, J.G. (2008). The response of the tide pool sculpin, *Oligocottus maculosus*, to hypoxia in laboratory, mesocosm and field environments. *Comp. Biochem. Physiol.* 149A: 284-292.

Storey, K.B., 1996. Oxidative stress: Animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29,1715-1733.

Taylor, H.H. e Greenaway, P. (1979). The structure of the gills and lungs of the arid-zone crab, *Holthuisana (Astrothelphusa) transversa* (Brachyura: Sundathelphusidae) including observations on arterial vessels within the gills. *J. Zool.* 189, 359–384.

Taylor, E.W., Butler, P.J. (1978). Aquatic and aerial respiration in the shore crab *Carcinus maenas* (L) acclimated to 15°C. *J. Comp. Physiol.* 127, 315–323.

Taylor, H.H. e Taylor, E.W. (1992). Gills and lungs: the exchange of gases and ions. In: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates—Decapod Crustacea*, vol. 10. Wiley–Liss, New York, pp. 203–293.

Taylor, E.W., Wheatly, M.G., (1979). The behavior and physiological responses of the shore crab *Carcinus maenas* during changes in environmental oxygen tension. *J. Comp. Physiol.* 86: 95–115

Thompson, R.K.; Pritchard, A.W. (1969). Respiratory adaptations of two burrowing crustaceans, *Callinassa californiensis* and *Upogebia pugettensis* (Decapoda, Thalassinidae). *Biol. Bull.* 136, 274- 287.

Turner, R.E. (1976). Geographic variation in salt marsh macrophyte production: a review. *Contribution in Marine Science, Houdson*, v. 20, p. 47-68.

Tyler, R.M. e Targett, T.E. (2007). Juvenile weakfish *Cynoscion regalis* distribution in relation to diel-cycling dissolved oxygen in an estuarine tributary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 333:257-269.

Tyler, R.M., Brandy, D.C. e Targett, T.E. (2009). Temporal and spatial dynamics of diel-cycling hypoxia in estuarine tributaries. *Estuar. Coasts* 32:123-145.

Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., (2008). Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. PNAS. 105, 15452-15457

Wells, R.M.G., (2009). Blood-gas transport and hemoglobin function: adaptations for functional and environmental hypoxia. In Hypoxia (ed. J. G. Richards, A. P. Farrell and C. J. Brauner), pp. 255-299. San Diego: Elsevier.

Wu, R.S.S. (2002). Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. Mar. Pollut. Bull. 45:35-45.

Zenteno-Savín, T., Saldierna, R., Ahuejote-Sandoval, M., (2006). Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. & Pharmacol. 142,301-308