UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS (FISIOLOGIA GERAL)

Daniela Dantas David

**PRESENÇA DO SISTEMA MELATONINÉRGICO E SEU PAPEL NO CICLO
DE MUDA DO SIRI-AZUL *Callinectes sapidus* (Crustacea Brachyura)**

PRESENCE OF THE MELATONINERGIC SYSTEM AND ITS ROLE IN THE
MOLT CYCLE OF THE BLUE CRAB *Callinectes sapidus* (Crustacea Brachyura)

**São Paulo
2018**

Daniela Dantas David

**PRESENÇA DO SISTEMA MELATONINÉRGICO E SEU PAPEL NO CICLO
DE MUDA DO SIRI-AZUL *Callinectes sapidus* (Crustacea Brachyura)**

PRESENCE OF THE MELATONINERGIC SYSTEM AND ITS ROLE IN THE
MOLT CYCLE OF THE BLUE CRAB *Callinectes sapidus* (Crustacea Brachyura)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Fisiologia Geral.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria de Lauro Castrucci

Co-orientadora: Dra. Flávia Pinheiro Zanotto

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP,
com os dados fornecidos pelo autor no formulário:
<http://www.ib.usp.br/biblioteca/ficha-catalografica/ficha.php>

David, Daniela Dantas

Presença do sistema melatoninérgico e seu papel no
ciclo de muda do siri-azul *Callinectes sapidus*
(Crustacea Brachyura) / Daniela Dantas David;
orientadora Ana Maria de Lauro Castrucci. -- São Paulo,
2018.

66 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia.

1. *Callinectes sapidus*. 2. Ciclo de muda. 3.
Melatonina. 4. Hormônio inibidor da muda. 5. Receptor de
ecdisteróides. I. Castrucci, Ana Maria de Lauro, orient.
II. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura da catalogação da publicação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Nome: David, Daniela Dantas

Título: Presença do sistema melatoninérgico e seu papel no ciclo de muda do siri-azul
Callinectes sapidus (Crustacea Brachyura)

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de
Fisiologia Geral.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof (a). Dr (a).

Prof^ª Dr^a Ana Maria de Lauro Castrucci
Orientadora

*A todos aqueles que fazem ciência
com ética, responsabilidade e amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Este espaço é muito pessoal, mas é o momento em que podemos deixar registrado para todos que um dia tenham curiosidade ou até mesmo necessidade de ler esta dissertação, entender a importância de ter pessoas ao nosso lado em qualquer que seja o momento de nossas vidas. É aqui que podemos dedicar um espaço ao longo de dois anos, para agradecer a todos que estão torcendo por nós, que se dedicaram junto a nós para que tudo isso pudesse acontecer.

Sendo assim, gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe Maria José, uma mulher forte, trabalhadora, persistente, engraçada, mãe de verdade, aquela que sempre me apoiou e me entendeu, mesmo depois de umas discussões que acabaram simplesmente porque nos amamos e amor e respeito estão acima de tudo; ao meu pai Sebastião, que em 2013 mudou de vida, mas mesmo assim, continuou respeitando as minhas escolhas e sempre me lembrando que o amor de Deus por nós é o maior de todos, saiba que o admiro e amo demais. Agradeço por acreditarem no meu potencial e depositarem esforços para que eu continuasse neste sonho, sei que não está sendo fácil estarmos distantes durante todo esse tempo. Agradecer à minha família, em especial minha irmã Bianca, que sempre foi base para o meu caráter mesmo sendo nós muito diferentes e que ainda me deu o meu maior presente o príncipe Lucas, que a tia ama e morre de saudades. Minhas primas Suzana e Thaynnara, por quem tenho o maior cuidado e preocupação, estão crescendo e eu estou perdendo tudo isso, mas sei que posso confiar nelas, obrigada por se fazerem presentes mesmo estando tão longe. Obrigada por tudo!

Agradeço a professora e co-orientadora desta dissertação, Flávia Zanotto por ter me dado a oportunidade de entrar na USP, me mostrando a beleza dos siris e ajudando na escrita do projeto inicial e com os materiais essenciais para manutenção dos animais.

Agradeço imensamente a minha orientadora professora Ana Maria de Lauro Castrucci, um exemplo de mulher, pesquisadora, orientadora que preza pela boa ciência e ética. Você me faz acreditar que temos que fazer ciência por amor, pois desde o dia que cheguei eu vejo o quanto você é cuidadosa e responsável com todos os membros do laboratório, tanto é que me ajudou quando eu precisei. Serei eternamente grata por esses anos enriquecedores ao seu lado. Fazer parte do seu laboratório têm sido de grande valia para minha vida profissional e pessoal. Só de pensar que essa união foi puro acaso do destino, que você confiou em mim, que assistiu a apresentação do meu projeto via

Skype e não viu que eu estava nervosa... hoje posso dizer que tenho a sorte de ter a orientadora mais competente do universo. Muitíssimo obrigada.

Agradeço a Nathalia (Nathy), uma das mulheres que mais admiro, inteligente, determinada e uma excelente profissional. Uma vez eu pensei em desistir, dar um tempo e foi você que procurei para desabafar e você me lembrou das vezes que caí e levantei e me encorajou dizendo que nem todo mundo é capaz disso e se eu sou, não devia desistir. Esse dia foi muito importante para mim, pois me fez perceber que é isso que eu quero para minha vida. Espero seguir seus passos e espero vê-la ir muito longe também, você merece demais!

Agora é a vez de agradecer ao chefinho Leonardo, ou melhor, Assis, por todos os ensinamentos, principalmente pela “paciência” e por ter se dedicado a me ensinar ser uma pesquisadora de verdade. Saiba que os momentos bons para mim são os que mais valem a pena e é isso que eu carrego de nossa amizade. Agradeço pelo reconhecimento sobre as minhas descobertas, isso com certeza tem uma porcentagem sobre a minha evolução profissional, por isso e por outras coisas você é um exemplo de pesquisador a ser seguido.

Aos colegas que passaram pelo laboratório, dos quais eu sinto muita falta, a Keila, inteligente, dedicada, cuidadosa, amiga, você é demais e ao Leandro, pessoa mais paciente que já conheci, sinto falta das nossas idas ao bandeirão, filosofando sobre as teorias do universo. Ao técnico de laboratório Márcio pela ajuda com a manutenção dos siris e pelas viagens de coleta que sempre são divertidas, tirando o momento em que eu não resistia e dormia.

As minhas meninas, as IC's, Isabella, Giovanna que já me viram chorar e choraram junto comigo, já me viram rir e riram junto comigo, quero que saibam que vocês têm muito futuro e obrigada por sempre me fazerem acreditar em mim, adoro vocês! A Glenda, minha primeira sucessora, a que escolheu trabalhar com os siris e que não desistiu de acreditar que sempre vai ser melhor, obrigada por confiar no meu trabalho e me ajudar nas tarefas.

Agradeço também aos meus amigos paraibanos, Joyce, Valéria, Danny, Évia, Suellen, Catraca, Alisson, Alysson, Alan, César, Camilla, Nathalia, Jessyca, Marina, Otoniel e todos os demais que fazem a minha alegria, que ouvem minhas angústias e me fazem acreditar que se eu estou aqui é porque eu mereço! Obrigada a todos vocês por me darem força e sempre me receberem de braços abertos quando vou a João Pessoa.

Amo vocês!! Obrigada aos meus vizinhos de quarto Neto e Kassiano, que se arriscaram a encarar a mesma aventura que eu, sucesso meninos!!

Agradeço aos amigos que fiz em São Paulo, essa cidade que me fez conhecer o mundo. Matheus Santos, essa pessoa linda, alto astral e amigo, obrigada pelas boas risadas, te amo! Luciana, cabeçudinha, como você mesma fala, a energia das pessoas é tudo e a sua é renovadora, torço muito por você, obrigada por tudo! E Welder, a pessoa que merece todos os meus sinceros agradecimentos. Minha vida mudou depois que conheci você, foi uma conexão inexplicável, agradeço demais por você ter entrado na minha vida... por muitas vezes me senti só e triste, mas depois que te conheci esses sentimentos sumiram, muito, mas muito obrigada por tudo, não quero nunca me afastar de você. Te amo!!

Agradeço aos professores e colegas do departamento que me ajudaram na execução de técnicas e empréstimos de equipamentos. Aos pescadores Claudemir e especialmente o Nelsinho, que nunca me deixou na mão e sempre foi gentil e educado.

As agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

E assim eu finalizo esses agradecimentos, com o coração cheio de amor e de gratidão por ter pessoas tão maravilhosas ao meu lado. Quero me desculpar se em algum momento eu decepcionei vocês, mas saibam que sempre tento fazer o meu melhor. Obrigada por tudo!

Obrigada Deus pela permissão de todas as coisas.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Ciclo de muda em crustáceos	12
1.2. Regulação do ciclo de muda	14
<i>1.2.1. Fatores ambientais.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.2. Fatores endógenos</i>	<i>16</i>
1.3. Melatonina uma molécula ubíqua	21
1.4. Melatonina em crustáceos	24
1.4. <i>Callinectes sapidus</i>, o siri azul	25
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	27
3. OBJETIVOS	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Coleta e manuseio dos exemplares	29
4.2. Procedimentos para imunocitoquímica	29
<i>4.2.1. Alinhamento das sequências proteicas</i>	<i>29</i>
<i>4.2.2. Dissociação celular.....</i>	<i>29</i>
<i>4.2.3. Imunocitoquímica para citometria de fluxo com imagem.....</i>	<i>30</i>
<i>4.2.4. Citometria de fluxo com imagem</i>	<i>31</i>
<i>4.2.5. Imunohistoquímica de cortes de pedúnculos</i>	<i>32</i>
4.3. Dosagem de melatonina hemolinfática	32
4.4. Expressão temporal dos genes do hormônio inibidor da muda <i>CasMIH</i> e do receptor de ecdisona <i>CasEcR1</i>	33
4.5. Efeito da injeção de melatonina sobre a expressão dos genes do hormônio inibidor da muda <i>CasMIH</i> e do receptor de ecdisona <i>CasEcR1</i>	35
4.6. Análises estatísticas.....	35
<i>4.6.1. Análise da concentração de melatonina hemolinfática</i>	<i>35</i>
<i>4.6.2. Análise dos dados de PCR quantitativo</i>	<i>35</i>
5. RESULTADOS	37
5.1. Expressão e quantificação das enzimas AANAT e ASMT	37
5.3. Expressão gênica temporal de <i>CasEcR1</i> e <i>CasMIH</i>	41

5.4. Influência da melatonina sobre a expressão gênica temporal de <i>CasEcR1</i> e <i>CasMIH</i>	44
6. DISCUSSÃO	46
7. AVANÇOS NO CONHECIMENTO E PERSPECTIVAS	51
8. CONCLUSÕES.....	52
9. REFERÊNCIAS	53

RESUMO

David, D. D. Presença do sistema melatoninérgico e seu papel no ciclo de muda do sirí-azul *Callinectes sapidus* (Crustacea Brachyura). 2018. 66 f Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Uma das marcantes características morfológicas e funcionais dos crustáceos e de outros artrópodes é a presença de um exoesqueleto que cria uma barreira física para o crescimento desses animais. Nos crustáceos, a muda é um evento cíclico, dividido em 5 estágios, e um deles compreende a troca desse exoesqueleto, permitindo o aumento de tamanho. O início, período e a frequência do ciclo de muda dependem da idade e do sexo do animal e de fatores ambientais e fisiológicos. Hormônios como os ecdiesteróides e o hormônio inibidor da muda produzidos e secretados pelos órgãos Y e X, respectivamente, atuam diretamente no ciclo de muda, porém outros hormônios podem regular, de forma positiva ou negativa, este processo. A melatonina é um hormônio encontrado amplamente no reino animal, porém em crustáceos, diferentemente do que ocorre nos vertebrados, a sua síntese e secreção não estão relacionadas com a presença ou ausência de luz, e seu papel na muda tem sido pouco investigado. Os animais foram aclimatados no laboratório à temperatura 22 ± 2 °C e ciclo claro-escuro 12h:12h LD, sendo os experimentos realizados nesta mesma condição. Considerando o acima exposto, os objetivos do presente trabalho foram (1) verificar a produção de melatonina no sirí azul *Callinectes sapidus*, através da investigação da expressão das enzimas AANAT e ASMT no pedúnculo óptico e hepatopâncreas, bem como os níveis hemolinfáticos da indolamina; (2) avaliar se existe um perfil oscilatório diário na expressão gênica dos fatores relacionados com a muda, *CasMIH* e *CasEcR1*; (3) verificar se a manipulação com melatonina exógena influencia essa expressão. Para isso, técnicas de imunohistoquímica, citometria de fluxo, ensaio imunoenzimático e PCR quantitativo foram empregadas. Nossos resultados demonstraram uma oscilação dos níveis hemolinfáticos de melatonina em siris em pré-muda, com pico às 8 horas; entretanto, no estágio de intermuda os níveis deste hormônio foram menores e constantes ao longo de 24 horas. Não pudemos comprovar a presença das enzimas da via de síntese da melatonina, uma vez que os anticorpos utilizados não apresentaram homologia às proteínas de *C. sapidus*. Quanto à expressão gênica, uma oscilação diária semelhante nos transcritos dos genes *CasMIH* e *CasEcR1* ocorreu no hepatopâncreas,

independente do estágio de muda. No pedúnculo óptico a oscilação dos genes em questão também foi semelhante, mas apenas na pré-muda; na intermuda houve entre eles uma relação de anti-fase. A administração de melatonina exógena (10^{-7} mol/siri) levou à inibição da expressão dos genes em relação ao controle: no caso de *CasMIH* foi de 99,7% no pedúnculo óptico e 100% no hepatopâncreas e o *CasEcR1* sofreu inibição de 77% no pedúnculo óptico e 99% no hepatopâncreas. A presença de melatonina na hemolinfa é um forte indício de que o animal a sintetiza e pode estar atuando no ciclo de muda, uma vez que a administração deste hormônio inibiu a transcrição dos genes relacionados ao processo. Diante disso, fica mais clara a relevância de entender a flutuação de hormônios que não estão classicamente envolvidos no ciclo de muda, essencial para o crescimento dos crustáceos, mas que podem apresentar a função de regular este processo, como a melatonina. Ademais, a melatonina poderá ser uma boa ferramenta a ser utilizada no cultivo do siri-azul, como agente indutor da redução do período de intermuda levando à uma ecdise precoce.

Palavras-chave: *Callinectes sapidus*, ciclo de muda, melatonina, hormônio inibidor da muda, receptor de ecdisteróides.

ABSTRACT

David, D. D. Presence of the melatoninergic system and its role in the molt cycle of the blue crab *Callinectes sapidus* (Crustacea Brachyura). 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

One of the remarkable morphological and functional features of crustaceans and other arthropods is the presence of an exoskeleton that creates a physical barrier for the animal growth. In crustaceans, molting is a cyclic event usually divided into five stages, one of them comprising the exoskeleton exchange what thus allows the increase in size. The onset, period, and frequency of the molt cycle depend on the animal age and sex, as well as on environmental and physiological factors. Hormones such as ecdysteroids and the molt-inhibiting hormone produced and secreted by the Y- and X- organ, respectively, exert direct effects on the molt cycle. Nevertheless, other hormones are known to positively or negatively regulate this process, such as melatonin. Melatonin is a hormone widely found in the animal kingdom, but in crustaceans, differently from what happens in vertebrates, its synthesis and secretion are not regulated by the presence or absence of light. In fact, its role in the molting process has been poorly investigated. The animals were acclimated in the laboratory at 22 ± 2 °C and light-dark cycle 12h:12h LD, and the experiments were performed under the same condition. Considering the above, the objectives of this study were to: 1) verify the production of melatonin in the blue crab *Callinectes sapidus*, through the evaluation of the expression of key enzymes involved in the synthesis of melatonin, AANAT and ASMT, in the eyestalk and hepatopancreas, as well as melatonin levels in the hemolymph; 2) evaluate whether there exists a daily oscillatory profile in gene expression of the related molt factors, *CasMIH* and *CasEcR1*; (3) whether the exogenous melatonin influences the expression of the latter genes. To achieve these goals, immunohistochemistry, flow cytometry, immunoenzymatic assay, and quantitative PCR techniques were used. Our results demonstrated an oscillation of the hemolymphatic levels of melatonin in premolt crabs, peaking at 8 AM; however, in the intermolt stage, the levels of this hormone were smaller and constant along 24 hours. We were not able to show the presence of the enzymes involved in melatonin synthesis, since the antibodies used had no homology with *C. sapidus* proteins. We also demonstrated a daily oscillatory profile of *CasMIH* and *CasEcR1* transcripts in hepatopancreas independently of the molt stage. In the

eyestalk the oscillatory profile of both genes was also similar, but only in the premolt stage; in intermolt, an antiphase relationship between both genes was found. The exogenous administration of melatonin (10^{-7} mol/crab) inhibited the expression of *CasMIH* by 99.7 and 100% in eyestalk and hepatopancreas, respectively, whereas *CasEcRI* was inhibited by 77% and 99%, in the eyestalk and hepatopancreas, respectively, compared to saline-treated animals. The presence of melatonin in the hemolymph is a reliable indicator that the animal synthesizes the hormone, and thus melatonin may influence the molt cycle since it inhibited the expression of molt-related genes. Therefore, the relevance of understanding the oscillation of hormones that are not classically involved in the molt cycle – essential for crustacean growth – but which can regulate the process, becomes evident. From an economic standpoint, melatonin may be a useful tool in culturing blue crab, which ultimately can shorten the intermolt stage period leading to an early ecdysis.

Keywords: *Callinectes sapidus*, molt cycle, melatonin, molt-inhibiting hormone, ecdysteroids receptors.

1. INTRODUÇÃO

1.1.Ciclo de muda em crustáceos

Os crustáceos pertencem ao filo Arthropoda e, assim como os insetos, possuem um exoesqueleto que reveste o corpo dando sustentação e conferindo-lhes resistência mecânica; por outro lado, a presença do exoesqueleto cria uma barreira física para o crescimento desses animais. Portanto, para permitir que o animal cresça é necessário que os indivíduos realizem a troca desse exoesqueleto em um processo denominado ciclo de muda (Chang, 1985; Chang et al., 2012). Este processo é dividido em cinco estágios: 1) pré-muda, o período em que o animal começa a se soltar da carapaça atual, ocorrendo neste período a reabsorção de minerais e nutrientes do exoesqueleto antigo, principalmente cálcio. Este estágio pode durar aproximadamente 14 dias; 2) ecdise, fase mais curta do ciclo, onde ocorrerá a apólise (separação da cutícula do antigo exoesqueleto com a epiderme) com duração de no máximo 12 horas; 3) pós-muda recente, período em que o animal realiza absorção ativa de água e sais, aumentando de tamanho, uma vez que o corpo está mole; 4) pós-muda tardia, os animais reiniciam a alimentação e parte do exoesqueleto se torna rígido. Os dois estágios de pós-muda duram aproximadamente 2 a 4 dias; 5) intermuda (ou anecdise), o exoesqueleto fica completamente rígido e o animal cessa o crescimento, sendo conhecido como o período mais longo do ciclo de muda podendo chegar a 45 dias (Lipcius e Herrnkind, 1982; Chang, 1995; Neto e Freire, 2007).

Geralmente a identificação da pré-muda é dada pela mudança de cor do pereópodo do apêndice natatório (5º par de pereópodos, Figura 1). No momento em que a borda desta estrutura se torna branca, “linha branca”, o animal está começando a entrar em pré-muda (aproximadamente 2 semanas para a ecdise). Esta linha vai ficando avermelhada, indicando que o animal está a 1 semana da ecdise (linha rósea) e quando a linha estiver vermelha, o animal estará a aproximadamente 2 dias da ecdise (Oesterling, 1995).

Figura 1. Identificação do estágio de pré-muda no siri-azul *Callinectes sapidus*. Setas apontam A) linha branca; B) linha rósea; C) linha vermelha. Adaptado de Oesterling, 1995.

O novo exoesqueleto começa a ser formado antes mesmo da ecdise, ao passo que o antigo vai se soltando do animal na pré-muda, dando lugar a uma nova cutícula (Figura 2) (Chang, 1995). Esta é subdividida em epicutícula, composta por lipoproteínas ligadas a sais de cálcio, exocutícula e endocutícula, que são formadas por fibras de quitina, e uma camada membranosa, composta por quitina e outras proteínas. Esta última camada é a mais interna, e tem papel importante na formação da nova cutícula, pois é dela que as células emergem e migram para a formação do novo exoesqueleto (Roer e Dillaman, 1984; Lima e Oshiro, 2006; Taylor et al., 2007).

O ciclo de muda em geral dura de 30 a 60 dias e a frequência pode variar de acordo com a idade do animal (Kuballa e Elizur, 2007). Os jovens, devido ao rápido crescimento, realizam mais mudas que os animais adultos. Há também uma diferença no padrão do ciclo de muda entre machos e fêmeas, uma vez que os machos precisam estar com a carapaça rígida para a cópula, ao contrário da fêmea que sofre a muda de maturação e, assim, fica com o corpo mole para receber os espermatóforos, ou seja, no momento da cópula os machos estarão em intermuda e as fêmeas em pós-muda (Shinozaki-Mendes et al., 2013). Após a muda da maturação, as fêmeas entram em estágio de anecdisse, e o ciclo de muda é interrompido. A não ser que sejam induzidas por algum fator exógeno, as fêmeas não realizam mais ecdises pelo resto da vida, já os machos continuam a realizar mudas (Havens e McConaughy, 1990).

Figura 2. Representação esquemática de eventos associados à formação do exoesqueleto ao longo do ciclo de muda. Ep = Epicutícula, Ex = Exocutícula, En = Endocutícula, Mb = Camada membranosa. Adaptado de Roer e Dilaman, 1984.

1.1. Regulação do ciclo de muda

1.2.1. Fatores ambientais

Luz, temperatura e salinidade são exemplos de fatores ambientais que regulam diversos processos fisiológicos, não só em crustáceos, mas em todos os organismos aquáticos (Wu et al., 2014; Dong et al., 2015; Pervaiz et al., 2015); ademais o ciclo de marés também serve de pista ambiental para animais que habitam estuários e o ambiente marinho (Abello et al., 1997; Dubofsky-Porter et al., 2017). O ciclo de muda é um processo conhecido dentre os crustáceos, para o qual foram relatadas alterações no período, frequência e incremento de muda quando submetidos a diferentes regimes destes fatores. O período do ciclo de muda determina a duração em dias entre uma ecdise e outra, já a frequência diz respeito ao número de ecdises realizadas pelo animal

em um determinado período de tempo; e o incremento é o ganho de peso/tamanho do animal entre uma ecdise e outra.

Estudos com espécimes do camarão *Litopenaeus vannamei* submetidos a flutuação gradual na intensidade de luz ao longo da fase de claro, alteração no comprimento de onda e alteração periódica abrupta da intensidade de luz na fase de claro, mostraram que todos esses parâmetros influenciam o crescimento (Guo et al., 2012a; Guo et al., 2012b; Guo et al., 2013). Indivíduos da espécie *Orconetes nais*, quando sujeitos a diferentes regimes de fotoperíodo, não apresentaram diferença na frequência da muda. Os períodos com duração da fase de claro de 8,5 e 12 horas promoveram o mesmo padrão de muda, já os animais expostos ao ciclo de 14:10 LD mantiveram mudas contínuas e irregulares ao longo de todo o estudo (Rice e Armitage, 1974).

Em 2013, Stoner e colaboradores avaliaram, por 60 dias, o efeito de diferentes condições de temperatura (1,5, 4,5, 8 e 12°C) em espécimes de *Paralithodes camtschaticus* e *Paralithodes platypus*; de acordo com os resultados, animais submetidos a temperaturas a partir de 8°C demonstraram um maior incremento de muda e um avanço no estágio de intermuda, em comparação com as temperaturas mais baixas. Juvenis de *Callinectes sapidus* foram observados ao longo de duas ecdises, submetidos a diferentes temperaturas (15, 19, 23, 26 e 30°C) e salinidades (3, 15 e 30‰). Os resultados indicaram que a salinidade não altera o período de intermuda e o incremento de muda, diferentemente da temperatura, onde as mais altas foram responsáveis por um maior crescimento individual, bem como um encurtamento do período de intermuda, indicando um avanço no ciclo de muda (Cadman e Weinstein, 1988). Gong e colaboradores (2015) também avaliaram salinidade e temperatura em juvenis de *Scylla paramamosain* e mostraram que na condição de 5‰ de salinidade os animais não realizaram muda, enquanto na condição de 40‰ ocorreu um atraso para a ecdise em consequência do aumento no período de intermuda; nas demais salinidades (10, 20 e 30‰) os animais não apresentaram diferenças no ciclo de muda. A respeito da temperatura, 39°C levou à mortalidade de 100% dos indivíduos, já em 14°C houve uma diminuição na atividade dos siris. Assim como nos trabalhos citados anteriormente, neste estudo, temperaturas mais altas, que não sejam letais, diminuem o período de intermuda, o que indica um encurtamento no ciclo de muda.

1.2.2. Fatores endógenos

Em artrópodes, quatro classes de compostos são mensageiros endócrinos que podem regular sua fisiologia, sendo estes, aminas biogênicas, peptídeos, esteroides e terpenoides. Dentre estas moléculas, os esteroides são convertidos em diferentes ecdisteróides, responsáveis principalmente pela indução da muda (Quackenbush, 1986; Chang, 1995; Chang et al., 2012). A estrutura responsável pela liberação desses hormônios nos crustáceos é o órgão Y (YO), um par de glândulas localizado no cefalotórax anterior à câmara branquial. O órgão Y possui características de um tecido esteroidogênico com numerosas mitocôndrias e um extenso retículo endoplasmático (Lachaise, 1993; Mykles, 2011). Os crustáceos não são capazes de sintetizar colesterol, molécula precursora dos ecdisteróides, tendo que obtê-lo através da dieta. O colesterol obtido na dieta liga-se a lipoproteínas de alta densidade na hemolinfa e é absorvido pelo órgão Y, onde é convertido em 5 β -dicetol e depois em vários ecdisteróides, como 3-deidro-25-desoxiecdisona (3D25dE), 3-deidroecdisona (3DE), ecdisona e 25-desoxiecdisona (25dE), que são posteriormente secretados (Mykles, 2011).

Por serem hormônios de natureza lipofílica, os ecdisteróides cruzam a membrana celular e dentro das células dos tecidos periféricos, tais como gônadas, hepatopâncreas, epiderme e brânquias, são convertidos em 20-hidroxiecdisona (20E) e ponasterona, esta última podendo sofrer ação de uma hidroxilase e também ser convertida em 20E (Mykles, 2011). 20-hidroxiecdisona e ponasterona são os ecdisteróides mais encontrados na hemolinfa de *C. sapidus* (Chung, 2010), e seus níveis variam de acordo com o estágio do ciclo de muda. Geralmente a concentração permanece baixa durante a intermuda, apresentando um pico na pré-muda, seguido de uma queda antes da ecdise (Mykles, 2011); este padrão foi observado em *C. sapidus* (Chung, 2010) e no lagostim *Procambarus clarkii* (Nakatsuji e Sonobe, 2004).

Os ecdisteróides possuem receptores nucleares que, funcionalmente, formam heterodímeros de EcR (receptor de ecdisona) e RXR (receptor do ácido retinóico em crustáceos) ou USP (*ultraspiracle protein* – ortólogo ao RXR em insetos), sendo o EcR responsável pela ligação ao seu mensageiro extracelular enquanto o RXR/USP facilita a ligação do heterodímero ao elemento responsivo do DNA. Os receptores nucleares em geral consistem de cinco domínios estruturais, sendo eles: um domínio de ativação da transcrição, localizado na região N-terminal, um domínio de ligação ao DNA para a ligação de elementos reguladores da transcrição de genes alvos, um domínio de dobra que confere flexibilidade à molécula, o domínio de ligação ao hormônio responsável

pela ativação da transcrição do gene alvo e um domínio de ativação da transcrição, localizado na região C-terminal (Hill et al., 2013; Techa e Chung, 2013).

Podem existir diversas isoformas para o receptor de ecdisteróides; em *C. sapidus* a diferença entre a isoforma *EcR1* e *EcR2* está no número de aminoácidos hidrofílicos no domínio de ligação ao hormônio.

A inativação dos hormônios ecdisteróides dá-se por sua metabolização e excreção pela urina, glândula antenal e fezes. Vários tecidos periféricos de crustáceos decápodes contêm a enzima 26-hidroxilase que converte 20E em 20,26-diidroxiecdisona (20,26E) e ponasterona em inokosterona (25-desoxi-20,26-diidroxiecdisona ou 25d20,26E); estes compostos quando oxidados formam ácidos “ecdisônicos” que são excretados pela urina (Williams et al., 2000; Mykles, 2011). Os ecdisteróides metabolizados pelo hepatopâncreas, sequestrados tanto da hemolinfa quanto do alimento, formam conjugados de ácidos graxos (conjugados apolares) para serem secretados nas fezes (Synder e Chang, 1991; 1992; Mykles, 2011).

Tanto a liberação quanto a ação dos ecdisteróides nos tecidos periféricos são reguladas principalmente por fatores hormonais presentes no pedúnculo óptico. Isto deve-se ao fato desta estrutura apresentar um complexo de células nervosas – o órgão X (XO) – cujos terminais axônicos se agrupam em uma estrutura denominada glândula do seio (SG) (Figura 3). O órgão X é responsável por sintetizar hormônios peptídicos e secretá-los na glândula do seio onde ficam armazenados até ocorrer a sua liberação para a hemolinfa (Chang e Mykles, 2011; Hopkins, 2012).

Figura 3. Representação morfológica do pedúnculo óptico. LG = *lamina ganglionaris*; ME = *medula externa*; MI = *medula interna*; MT = *medula terminalis*; SG = glândula do seio; XO = órgão X; ON = nervo óptico. Serrano et al., 2004.

Dentre os hormônios sintetizados no complexo órgão-X/glândula do seio, temos os hormônios de concentração e dispersão de pigmentos, PCH e PDH, respectivamente (Nery e Castrucci, 1997; 2002) e a superfamília dos hormônios hiperglicemiantes de

crustáceos (CHH). Esta superfamília é subdividida em dois grupos: CHH tipo I, constituído pelo hormônio hiperglicemiante propriamente dito, apresentando de 70 a 72 aminoácidos e CHH tipo II, que inclui os hormônios inibidor da muda (MIH), inibidor do metil farnesoato (MIOH), inibidor gonadal (GIH) e inibidor da vitelogênese (VIH), geralmente com 70 a 78 aminoácidos. Todos estes hormônios possuem resíduos de cisteína, porém arrançados de forma distinta entre os dois grupos (Nakatsuji et al., 2009; Christie et al., 2010; Webster et al., 2012; Katayama, 2016).

A fim de entender a regulação negativa do MIH sobre o ciclo de muda, experimentos de excisão do pedúnculo óptico eram e ainda são utilizados, e os resultados corroboram a ideia de que o fator responsável pela inibição da muda está presente no pedúnculo óptico (Bittner e Kopanda, 1973; Aktas et al., 2003; Hensi et al., 2008).

O MIH age antagonicamente aos ecdisteróides no processo de muda, durante o qual os níveis hemolinfáticos destes dois hormônios variam em anti-fase ao longo do ciclo. Como dito anteriormente, o pico de ecdisteróides ocorre próximo ao momento da ecdise, na pré-muda, enquanto o MIH permanece com altos níveis hemolinfáticos durante toda a intermuda (Quackenbush, 1986; Chang, 1995; Philippen et al., 2000). Lee e colaboradores (1998), avaliando os níveis de RNAm do MIH em relação à concentração de ecdisteróides durante o ciclo de muda em *C. sapidus*, observaram um aumento do RNAm na intermuda e na pós-muda e uma diminuição na pré-muda, contrastando com os ecdisteróides. Ademais, Nakatsuji e colegas (2000) mostraram que os níveis de MIH na glândula do seio ficam altos na pré-muda, devido à diminuição da secreção neste período.

Ainda não foi caracterizado um receptor específico para MIH em nenhuma espécie de crustáceo, porém órgãos Y do caranguejo *Cancer antennarius* exibiram um aumento de 4 vezes nos níveis de cAMP quando incubados com extratos de pedúnculo óptico. Além disso, análogos permeáveis de cAMP e cGMP foram utilizados para mimetizar o efeito de MIH sobre o órgão Y e apenas cAMP teve efeito (Mattson e Spaziani, 1985). Em contrapartida, para *C. sapidus* e *P. clarkii*, os níveis de cGMP aumentaram em órgãos Y após incubação com recombinante de MIH, sugerindo que nestas espécies a via de sinalização para a inibição da muda por MIH inclui cGMP (Nakatsuji et al., 2006a; Nakatsuji et al., 2006b).

A síntese de cGMP é catalisada por guanilil ciclase que converte GTP em cGMP. Existem dois tipos desta enzima, a guanilil ciclase solúvel (sGC) ativada pelo

aumento de óxido nítrico e o receptor guanilil ciclase (rGC) disposto na membrana celular. Zeng e colegas (2008) sugeriram que MIH eleva os níveis de cGMP através do rGC, uma vez que, em dados não publicados, eles observaram que um doador de óxido nítrico não suprimiu a ecdisteroidogênese. Para comprovar a hipótese, eles demonstraram a presença do rGC no órgão Y de *C. sapidus*, como também, a expressão do gene que codifica o receptor ao longo do ciclo de muda, onde a maior expressão foi na intermuda, que é o estágio em que os níveis hemolinfáticos de MIH estão mais altos. Em *C. antennarius*, outro segundo mensageiro pode estar envolvido na inibição da ecdisteroidogênese, pois Mattson e Spaziani (1986) mostraram que um efluxo de Ca^{2+} leva à supressão da síntese de ecdisteróides, assim como um aumento de cálcio intracelular induz a ecdisteroidogênese.

Outro hormônio considerado regulador positivo da muda, por apresentar maiores concentrações no estágio de pré-muda, é o metil farnesoato (MF), um sesquiterpeno produzido no órgão mandibular. Disposto na base do tendão associado ao músculo adutor posterior das mandíbulas, este hormônio é similar ao hormônio juvenil III (JH III) presente em insetos (Nagaraju, 2007; 2011). A via biossintética do MF é dividida em duas etapas: na primeira, o pirofosfato de farnesil (FPP), comum na biossíntese de outros esteroides e terpenoides, é formado, e nas várias fases da segunda etapa, o FPP é hidrolisado por uma pirofosfatase em farnesol, que em seguida é oxidado a ácido farnesóico (AF). Por fim, AF é convertido em MF por ácido farnesóico *O*-metiltransferase (FAO-MeT), na presença de *S*-adenosil metionina (SAM) e monooxigenase P450 (Borst et al., 2001; Nagaraju, 2007).

A síntese de MF pelo órgão mandibular é regulada negativamente por um fator peptídico do complexo órgão X/glândula do seio, o hormônio inibidor do metil farnesoato (MIOH). Experimentos de excisão de pedúnculo óptico mostraram hipertrofia do órgão mandibular, mudanças no núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático, características envolvidas no aumento da atividade do órgão mandibular (Hinsch, 1977); além de um aumento na síntese de MF em *P. clarkii* (Chaves, 2001; Nagaraju, 2007).

O MF além de apresentar um papel na estimulação do desenvolvimento gonadal (Nagaraju, 2011), possui ação sobre o órgão Y e na produção de ecdisteróides, demonstrada em vários trabalhos. Injeção de MF causou aceleração na muda do caranguejo *Oziotelphusa senex senex* (Reddy et al., 2004), incubação de OY com MF aumentou a secreção de ecdisteróides (Tamone e Chang, 1993), além dos níveis

hemolinfáticos de MF seguirem o mesmo padrão dos ecdisteróides ao longo do ciclo de muda (Nagaraju et al., 2006; Nagaraju, 2011), o que confere a característica de um possível regulador positivo do ciclo de muda.

Além dos clássicos órgãos endócrinos, o hepatopâncreas de crustáceos, também conhecido como glândula do intestino médio, exerce papel importante no metabolismo, atuando na digestão, bem como na absorção de lipídeos, glicogênio e minerais, que estão envolvidos em processos de muda e reprodução, por exemplo. Além disso, atua na osmorregulação, excreção e detoxificação de poluentes. Este órgão consiste em numerosos túbulos e cada um deles contém células que realizam diversas funções como secreção de enzimas, absorção e estoque de nutrientes, além de estocar minerais. Os 4 tipos celulares presentes no hepatopâncreas são: células embrionárias, fibrilares, reabsortivas e secretoras. Já foram estudadas alterações nesta glândula durante a fase de intermuda e os resultados demonstraram mudanças citológicas e histoquímicas, ressaltando sua importância na mobilização de cálcio para a formação da nova carapaça (Zanotto e Weatly, 2002; Marcolin et al., 2008).

A rigidez da carapaça é dada pela sua calcificação, a partir da deposição de carbonato de cálcio no exoesqueleto hidrostático. No período de pós-muda, os crustáceos são capazes de acumular Ca^{2+} , e convertê-lo em CaCO_3 para endurecer o exoesqueleto, e o período de calcificação após a ecdise vai depender do hábitat e da disponibilidade de Ca^{2+} no meio ambiente (Sá et al., 2010).

O equilíbrio de cálcio em crustáceos, na sua maior parte, é promovido pelo estômago cardíaco, hepatopâncreas ou o ceco posterior, dependendo do grupo. No estômago cardíaco de alguns crustáceos formam-se gastrólitos - agregados de carbonato de cálcio - que abrigam 17% dos 20% do cálcio remanescente no corpo após a ecdise. Na fase de pós-muda, estes gastrólitos são digeridos, reabsorvidos e utilizados para calcificar principalmente o aparelho bucal, os ossículos gástricos e os dácilios das patas. Já no hepatopâncreas, o cálcio é armazenado em forma de CaPO_4 formando esférulas que ficam localizadas nas mitocôndrias de suas células, totalizando 7 a 10% da carapaça perdida (Zanotto e Weatly, 2002; Marcolin et al., 2008).

O hepatopâncreas, assim como o ovário, produz e secreta vitelogenina, uma molécula precursora do vitelo e desta forma é importante na reprodução. O papel e a contribuição da vitelogenina do hepatopâncreas variam de espécie para espécie e algumas não a requerem (Subramoniam, 2011). No camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii*, os níveis de vitelogenina no hepatopâncreas e hemolinfa

aumentaram de acordo com o aumento do índice gonadossomático; com a excisão do pedúnculo óptico essas repostas foram adiantadas ao longo do ciclo de muda, isto porque o VIH não está mais presente (Jayasankar et al., 2002).

Luo e colaboradores (2015) sugerem que isoformas de MIH podem atuar sobre o hepatopâncreas regulando a síntese de vitelogenina no camarão *Litopenaeus vannamei*. Fêmeas de *C. sapidus* em fase vitelogênica apresentaram níveis aumentados de MIH na hemolinfa, além do que a incubação do hepatopâncreas com MIH levou a um aumento de vitelogenina., demonstrando que o MIH é hormônio importante no equilíbrio da muda e da reprodução (Zmora et al., 2009a, Zmora et al., 2009b).

A regulação hormonal envolvida no ciclo de muda está resumida na Figura 4.

Figura 4. Esquema geral de fatores endógenos envolvidos no ciclo de muda de crustáceos. MIH = hormônio inibidor da muda; MIOH = hormônio inibidor do órgão mandibular; VIH = hormônio inibidor da vitelogênese; MF = metil farnesoato. Linhas verdes = regulação positiva; linhas vermelhas = regulação negativa.

1.3. Melatonina uma molécula ubíqua

A melatonina é um hormônio encontrado em todas as espécies nas quais já foi investigada, incluindo organismos unicelulares, plantas e animais invertebrados e vertebrados (Vivien-Roels e Pévet, 1993; Roopin e Levy, 2012; Hardeland e Poeggeler, 2003; Tan et al., 2016). A melatonina é uma indolamina derivada do triptofano e sua

síntese ocorre em quatro etapas. Na primeira, o triptofano é hidroxilado na posição 5, formando o 5-hidroxi-triptofano que, por sua vez é descarboxilado, resultando em serotonina. A serotonina é N-acetilada pela enzima arilalquilamina N-acetiltransferase (AANAT) em N-acetilserotonina que, por fim, é convertida em melatonina pela enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), atualmente denominada de ASMT (acetilserotonina O-metiltransferase).

Em mamíferos, sua síntese, embora realizada majoritariamente nos pinealócitos da glândula pineal durante a fase de escuro do dia, acontece também em tecidos periféricos (Venegas et al., 2012; Pires-Lapa et al., 2013; Acuña-Castroviejo et al., 2014). A informação luminosa é percebida por uma subpopulação de células ganglionares da retina, intrinsecamente fotossensíveis (ipRGCs) que, através de sinais neurais, regulam a síntese da melatonina. Na presença de luz, as células ganglionares (ipRGCs) emitem uma sinalização glutamatérgica excitatória para o núcleo supraquiasmático (SCN) que, por sua vez ao ser excitado, libera uma sinalização inibitória para o núcleo paraventricular (PVN), impedindo-o de sinalizar para o núcleo intermediolateral (ILCC) e o gânglio cervical superior (SCN), inibindo assim a síntese de melatonina na pineal. Por outro lado, na ausência de luz, o SCN não é mais estimulado e deixa de inibir o sinal excitatório induzido pelo PVN para o ILCC e, consequentemente, o SCG. Os neurônios noradrenérgicos do SCG liberam norepinefrina (NE) que irá atuar em receptores β -adrenérgicos acoplados a proteína $G_{\alpha s}$ presentes nos pinealócitos. A ligação da NE em seus receptores β -adrenérgicos é a principal via para a síntese de melatonina. Ela é responsável pela ativação da adenilil ciclase, que promove um aumento de cAMP e ativação de quinases como a proteína quinase dependente de cAMP (PKA); esta, por sua vez, atuará no núcleo ativando a transcrição da AANAT e a síntese de melatonina (Reiter et al., 2014). Uma outra via é mediada pelos receptores α -adrenérgicos que leva à ativação de uma quinase dependente de cálcio (PKC) responsável por fosforilar os receptores β -adrenérgicos, reforçando a via principal (Ceinos et al., 2004) (Figura 5). Em resumo, em vertebrados, sejam eles de hábitos diurnos ou noturnos, a síntese de melatonina pela glândula pineal dá-se durante a noite, uma vez que a luz inibe a transcrição da AANAT, uma das enzimas responsáveis pela conversão de serotonina em N-acetilserotonina, considerada por vezes, o passo limitante da via.

Figura 5. Circuito neural regulador da síntese de melatonina em vertebrados em geral. Setas verdes indicam o efeito da luz e setas vermelhas o efeito do escuro sobre a síntese de melatonina; setas marcadas com “X” significam o sinal inibido. ipRGCs = células ganglionares intrinsecamente fotossensíveis; RHT = trato retino-hipotalâmico; SCN = núcleo supraquiasmático; PVN = núcleo paraventricular; ILCC = núcleo intermediolateral; SCG = gânglio cervical superior; NE = norepinefrina; cAMP = monofosfato cíclico de adenosina; PKA = proteína quinase dependente de cAMP; PKC = proteína quinase dependente de cálcio AANAT = arilalquilamina N-acetiltransferase.

A melatonina é uma molécula anfifílica, portanto tem a capacidade de cruzar a membrana celular e atuar dentro da célula, mas ao mesmo tempo, atua em receptores de membrana. Os receptores MT1 e MT2 geralmente estão acoplados a proteína G_{ai} que, quando ativada, reduz os níveis de cAMP e consequentemente diminui a ativação do fator de transcrição CREB pela PKA, porém foi demonstrado que esses receptores podem se acoplar a outras proteínas G (Brydon et al., 1999). Já o receptor de melatonina MT3 é uma quinona redutase e tem ação detoxificante (Nosjean et al., 2001; Mackenzie et al., 2002; Witt-Enderby et al., 2003; Slominski et al., 2012; Zlotos et al., 2014). A ação intracelular da melatonina é similar à de um *scavenger* clássico, atuando na transferência de elétrons simples e de hidrogênio de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS); age também na cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo

os radicais livres pela adição de um terminal hidroxila (Allegra et al., 2003; Galano et al., 2011; Reiter et al., 2014).

Vários outros efeitos fisiológicos nos quais a melatonina participa vêm sendo estudados nos vertebrados, como o seu papel no sistema imune (Carrilo-Vico et al., 2005; Markus e Ferreira, 2011), sua função sobre o metabolismo (Cippola-Neto et al., 2014), na reprodução sazonal (Reiter et al., 2009; Dardente 2012) entre outros.

1.4. Melatonina em crustáceos

Como dito, a melatonina é uma molécula encontrada praticamente em todos os filos estudados e aparentemente a maquinaria biossintética é similar em todos. No entanto, para várias espécies de crustáceos, a síntese e secreção de melatonina não estão relacionadas com a presença ou ausência de luz, uma vez que os picos desse hormônio aparecem em horários variados, independentes da luz (Agapito et al., 1995; Tilden et al., 1997; Maciel et al., 2008; Markowska et al., 2009; Sainath et al., 2013), embora seus níveis oscilem de forma circadiana. Nos crustáceos, sua presença foi relatada nos pedúnculos oculares, na hemolinfa e em outros núcleos do sistema nervoso (Cary et al., 2012; Sainath et al., 2013; Tan et al., 2014). Tilden e colaboradores (2001) avaliaram a síntese de melatonina e a atividade da enzima AANAT em pedúnculos ópticos de *Uca pugilator* submetidos a várias condições de fotoperíodo. Os resultados mostraram que os níveis totais de melatonina foram maiores em animais submetidos a luz constante, do que em ciclo de claro e escuro (12:12) ou escuro constante, concomitante com o aumento na atividade da enzima; porém o autor não concluiu se AANAT é um passo limitante na velocidade de síntese da melatonina.

Nos crustáceos, já foi demonstrado que a melatonina participa na regulação de vários mecanismos fisiológicos (Sainath et al., 2013), como por exemplo, na indução do crescimento e regeneração de membros de *U. pugilator*, na inibição da produção de MIH estimulando indiretamente a produção de ecdisteróides, ou ainda agindo diretamente na ecdisteroidogênese (Tilden et al., 1997). Já foi demonstrada sua participação no sistema de defesa antioxidante nas brânquias (Maciel et al., 2010), no sistema muscular locomotor (Geihs et al., 2010) e frente a condições de hipóxia e reoxigenação em *Neohelice granulata* (Geihs et al., 2016). Tem papel também na regulação dos níveis de glicose, induzindo a hiperglicemia independente do hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) (Sainath e Reddy, 2010a), na indução precoce da muda em *Oziotelphusa senex senex* (Sainath e Reddy, 2010b), na regulação do

metabolismo inibindo a expressão do CHH e induzindo a hiperglicemia em resposta à hipóxia no caranguejo *N. granulata* (Maciel et al., 2014). Ademais, Girish e colaboradores (2015) relataram que a injeção de melatonina aumentou significativamente a concentração de ecdisteróides e metil farnesoato na hemolinfa da espécie *S. serrata*.

1.4. *Callinectes sapidus*, o siri azul

Callinectes sapidus, conhecido popularmente como siri-azul, é a espécie mais bem-sucedida em águas temperadas, sendo um dos organismos estuarinos mais estudados (Figura 6).

Figura 6. Foto ilustrativa da espécie *Callinectes sapidus*, o siri-azul. Retirada de <https://www.inaturalist.org/taxa/49504-Callinectes-sapidus>.

Habita desde regiões entre-marés até 90 metros de profundidade, ocorrendo em baías, estuários e lagoas (Melo, 1996). Esta espécie sofre entre 18 e 22 mudas antes de chegar à fase adulta, e tem sobrevivência de 2 a 3 anos (Hines et al., 1987; Rodrigues e D’Incao, 2008). A grande maioria dos trabalhos vem focando questões relacionadas a ciclos de vida (Freeman et al., 1987; Hines et al., 1987; Havens e McConaughy, 1990; Rodrigues e D’Incao, 2008), regulação do ciclo de muda (Chung, 2010; Techa e Chung, 2013; Techa e Chung, 2015) como também regulação dos níveis de cálcio na muda (Becker et al., 1974; Cameron, 1989; Perry et al., 2001; Chen e Watson, 2011, Chen et al., 2012). Porém hormônios candidatos a regular o ciclo de muda nesta espécie, a exemplo da melatonina, não têm sido investigados. Poucos crustáceos possuem o genoma sequenciado; em 2015, Yednock e colaboradores realizaram o transcriptoma de

novo do hepatopâncreas de *C. sapidus* permitindo que estudos de expressão gênica sejam feitos a fim de enriquecer o conhecimento sobre diversos processos fisiológicos.

C. sapidus é uma das inúmeras espécies de crustáceos com alto valor econômico. O siri-mole, prato derivado da espécie em questão, é uma iguaria bastante conhecida e para seu cultivo o conhecimento sobre o ciclo de muda é importante, uma vez que o animal deve estar em fase de pós-muda (consistência corporal mole) para que possa ser comercializado. Em 1995, Oesterling publicou um manual sobre o manuseio e ciclo de muda do *C. sapidus*.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os crustáceos formam um grupo de grande importância econômica, uma vez que são cultivados para consumo humano. Como visto, o estágio de pós-muda confere ao animal uma consistência mole, e é nesse período que acontece sua comercialização. Desde 1800, os siris da espécie *Callinectes sapidus* (siri-azul) são cultivados, e tornaram-se iguaria na América do Norte, sendo encontrados também no Brasil e Argentina. O ciclo de muda é influenciado por vários fatores endógenos e exógenos. Ecdiesteróides são precursores de hormônios como a ecdisona, que tem o seu papel bem reconhecido para várias espécies, sendo um dos principais atores no processo da muda. Além dela, o MF e MIH atuam como reguladores da muda. Embora a regulação sazonal do ciclo de muda seja bem discutida para várias espécies, a expressão e ação circadiana dos hormônios relacionados a este processo são pouco estudadas. A melatonina, um hormônio com variação circadiana, é conhecida para algumas espécies como regulador positivo na indução da muda e reprodução; porém, a presença e o padrão de síntese de melatonina ainda não foram relatados em *C. sapidus*. Entender a fisiologia de animais como o *C. sapidus* traz resultados relevantes tanto economicamente, que podem ser utilizados para a melhoria do cultivo, quanto fisiologicamente, ampliando o conhecimento de ações hormonais em eventos importantes para a conservação da espécie.

Diante disto a hipótese deste trabalho supõe que os genes de fatores relacionados com o ciclo de muda apresentam uma variação em sua expressão ao longo de 24 horas e que esta variação pode estar relacionada com a variação diária dos níveis de melatonina na hemolinfa dos siris. Ademais, a injeção diária de melatonina exógena como técnica para indução do ciclo de muda altera os níveis de expressão gênica dos fatores relacionados com a muda, podendo alterar o perfil oscilatório diário.

3. OBJETIVOS

- Caracterizar a presença do sistema melatoninérgico no hepatopâncreas e pedúnculo óptico do *Callinectes sapidus* através de citometria de fluxo com imagem e imunohistoquímica, respectivamente, em animais submetidos a ciclo de claro e escuro LD 12 h:12 h;
- Avaliar os níveis diários da melatonina na hemolinfa de *Callinectes sapidus* submetidos a ciclo de claro e escuro LD 12 h:12 h;
- Avaliar a expressão temporal dos genes relacionados com o ciclo de muda *CasEcR1* e *CasMIH* em animais submetidos a ciclo de claro e escuro LD 12 h:12 h;
- Caracterizar o efeito da melatonina sobre a expressão dos genes *CasEcR1* e *CasMIH* em *Callinectes sapidus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta e manuseio dos exemplares

Machos e fêmeas de *C. sapidus* foram adquiridos de pescadores da região de Iguape, SP, nos meses de março a maio de 2017. Os animais foram transportados até o laboratório e separados equitativamente em 4 tanques com 10 litros de água do mar artificial (água destilada e sal marinho, hw-Marinemix[®], Reefer) com salinidade de 10‰ e aeração constante. Durante o período de manutenção, os animais permaneceram em ambiente com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ e em fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (12:12 LD) com intensidade luminosa de 400 lux ($58 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, luz branca, 420 a 750 nm) mensurada com o auxílio de um luxímetro (LX-102, Lutron Eletronic Enterprise, Taipei, Taiwan). A manipulação no período escuro foi realizada com o auxílio de óculos de infra-vermelho. Os siris nos estágios de intermuda e pré-muda permaneceram individualizados durante 3 dias, em caixas plásticas com 1,5 L de água do mar artificial, submetidos às mesmas condições do período de aclimação e manutenção.

4.2. Procedimentos para imunocitoquímica

4.2.1. Alinhamento das sequências proteicas

Inicialmente, foi realizada uma análise de homologia da proteína AANAT de *Rattus norvegicus* (NP_036950.1), uma vez que o anticorpo utilizado foi gerado contra a proteína desta espécie. A comparação foi feita pelo programa Protein BLAST disponibilizado na plataforma do National Institutes of Health (NIH) (blast.ncbi.nlm.nih.gov) com as proteínas de artrópodes depositadas neste mesmo banco de dados. Dentre as sequências disponíveis, as espécies que mais se aproximavam de crustáceos eram *Bombyx mori* (NP_001073122.1), *Oncopeltus fasciatus* (AMW91815.1), *Chilo suppressalis* (AKL78851.1), *Biston betularia* (ADF43200.1) e *Antheraea pernyi* (ABD17803.1), todas do filo Arthropoda da ordem Insecta. Para a proteína ASMT, não havia nenhum artrópode, portanto não fizemos a análise em questão.

4.2.2. Dissociação celular

O protocolo de obtenção de células dissociadas do hepatopâncreas foi adaptado de Ortega et al. (2011), sendo todas as etapas realizadas em Pantin livre de cálcio e

magnésio. Siris foram crioanestesiados a cada 8 horas, durante 24 horas; para tanto, foram colocados individualmente em caixa de isopor e mantidos em freezer (-20°C) por 10 minutos. Após esse período, a carapaça dorsal foi removida e o hepatopâncreas excisado e colocado em 50 mL de 0,5% de tripsina (TrypLE™ Express, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) em salina de Pantin, pH 7,6 (Tabela 1). O béquer contendo o tecido foi colocado em agitador magnético por 15 minutos; ao fim deste tempo foram adicionados 500 µL de soro fetal bovino para a inativação da tripsina. O conteúdo passou por uma micropeneira para um tubo de centrífuga de 15 mL, seguido de centrifugação a 14,3 x g por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante em seguida. Ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de salina de Pantin (Tabela 1) e o conteúdo foi novamente passado em filtros com poros de 100 µm, sendo a amostra dividida em dois tubos de centrífuga de 1,5 mL. O material foi centrifugado a 100 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o *pellet* fixado em 100 µL de paraformaldeído 4% em salina de Pantin por 15 minutos em gelo, para o procedimento de imunohistoquímica e citometria de fluxo com imagem. Até o momento não foi possível estabelecermos um sistema de dissociação eficiente para o pedúnculo óptico, razão pela qual não realizamos a citometria de fluxo de imagem com este órgão.

Tabela 1. Composição osmótica das salinas de Pantin (1 litro)

Osmólitos	Concentração (mM)		Peso (g)	
	Com Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Sem Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Com Ca ²⁺ e Mg ²⁺	Sem Ca ²⁺ e Mg ²⁺
NaCl	400	400	23,43	23,43
KCl	10	10	0,75	0,75
Na ₂ SO ₄ anidro	27	27	3,95	3,95
NaHCO ₃	2,4	2,4	0,21	0,21
MgCl ₂ .6H ₂ O	52,13	0	10,6	0
CaCl ₂ anidro	7,6	0	1,12	0
EDTA	0	20	0	5,583

4.2.3. Imunocitoquímica para citometria de fluxo com imagem

Os procedimentos de imunocitoquímica e imunohistoquímica foram executados com Pantin livre de cálcio e magnésio. Após a fixação, a suspensão de células

dissociadas de hepatopâncreas foi centrifugada a 100 x g por 5 minutos e o sobrenadante descartado, seguindo-se uma lavagem em Pantin por 10 minutos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro de cabra 6% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em salina de Pantin contendo 22,52 mg/mL de glicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 60 minutos a 4°C. Uma nova lavagem com Pantin por 10 minutos foi realizada seguida de incubação das amostras com anticorpos primários anti-AANAT ou anti-ASMT (ambos 1:500, Imuny Anticorpos Nacionais, São Paulo, SP, BR) diluídos em tampão de incubação, *overnight* a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, as amostras passaram novamente por lavagem em Pantin por 10 minutos e foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho (feito em carneiro, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) conjugado ao fluoróforo FITC na diluição 1:500 em tampão de incubação por 1 hora em temperatura ambiente. O tampão de incubação utilizado para a diluição dos anticorpos é composto de 1% de albumina de soro bovino (Amresco, Solon, OH, USA), 0,25% de carragenina lambda e 0,3% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em salina de Pantin. Por fim as amostras passaram por lavagem com Pantin por 10 minutos e foram submetidas a procedimentos experimentais de citometria de fluxo com imagem.

4.2.4. Citometria de fluxo com imagem

A identificação e quantificação da expressão das enzimas nas células do hepatopâncreas foram realizadas graças à colaboração estabelecida com o Dr. Sanseray da Silveira Cruz-Machado, membro do laboratório da Prof^a Regina Markus de nosso departamento. O aparelho utilizado foi o Amnis (*FlowSight imaging flow cytometer*, Merck-Millipore, Darmstad, Alemanha) com laser 488 nm para a aquisição das imagens pelo software *Inspire*. Essa técnica permite combinar sensibilidade de coloração microscópica de células individuais com a vantagem de contagem de células para análise. Todas as aquisições foram feitas em aumento de 20x em um fluxo de baixa velocidade. Foram coletados eventos para cada condição: controle negativo (omissão do anticorpo primário), grupos experimentais (anticorpo específico para cada proteína). A identificação das células isoladas foi realizada com base em um gráfico de dispersão considerando a área de campo claro e o tamanho celular. Uma janela foi desenhada em torno da população contendo potenciais células individuais com base nos critérios de tamanho celular, excluindo *debris* e *duplets* celulares. Os dados adquiridos foram analisados utilizando o software *Ideas*.

4.2.5. Imunohistoquímica de cortes de pedúnculos

Os animais foram crioanestesiados a cada 8 horas, durante 24 horas seguindo o mesmo protocolo citado anteriormente. Os pedúnculos ópticos foram excisados e colocados por 24 horas em 8 mL de paraformaldeído 4% em Pantin substituídos a seguir por uma solução de sacarose 30% em Pantin até que o órgão incorporasse a solução e descesse ao fundo do tubo. Após esse período, os pedúnculos foram seccionados em cortes de 20 µm (criostato Leica CM3050S, Leica Biosystems, Wetzlar, GER) e aderidos a lâminas gelatinizadas que permaneceram em freezer (-20°C) até o momento da imunohistoquímica. Para a gelatinização das lâminas, 2,5 g de gelatina foram adicionadas a 500 mL de H₂O (Milli-Q), sendo a solução aquecida em banho-maria a 60°C, até a completa dissolução da gelatina. Posteriormente a solução foi resfriada em temperatura ambiente e a ela adicionado 0,25 g de alúmen de cromopotássio (KCrS₂O₈). A solução foi novamente aquecida e colocada em um recipiente de vidro, no qual as lâminas foram mergulhadas durante 1 minuto. Por fim as lâminas foram levadas a estufa 37°C até a secagem completa. As duas últimas etapas foram repetidas duas vezes.

O protocolo de imunomarcção das proteínas AANAT e ASMT seguiu o descrito no item 4.2.3. Ao final, as lâminas foram montadas com o meio aquoso DAPI – Vectashield Hard (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e cobertas com lamínula. As imagens foram obtidas em um microscópio invertido de fluorescência (Axiovert 40CLF, Zeiss, Oberkochen, Germany) com uma lâmpada de mercúrio de 50 W e filtro para DAPI (excitação 358 e emissão 463 nm) ou FITC (excitação 496 e emissão 520 nm).

4.3. Dosagem de melatonina hemolinfática

Os animais em intermuda e pré-muda foram crioanestesiados para a retirada de hemolinfa da membrana artrodial do 5º pereiópodo, a cada 8 horas, ao longo de 24 horas e a quantificação de melatonina foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) (IBL International, Flughafenstr, HH, GER). Os níveis de melatonina das amostras foram interpolados em uma curva padrão com concentrações de 0,0 pg/mL a 300 pg/mL, além de controles com quantidades de melatonina conhecidas (as soluções para a curva e os controles foram fornecidas no kit). Os dados foram expressos em pg/mL.

4.4. Expressão temporal dos genes do hormônio inibidor da muda *CasMIH* e do receptor de ecdisona *CasEcR1*

Os animais em intermuda e pré-muda permaneceram nas condições experimentais descritas no tópico 4.1. e após 3 dias individualizados, foram crioanestesiados a cada 8 horas, ao longo de 24 horas. Os tecidos hepatopâncreas e pedúnculo óptico foram excisados e armazenados em freezer -80°C. Para a extração de RNA total, foi utilizado um homogeneizador com pistilos estéreis em 300 µL de Trizol (Ambion, Carlsbad, CA, EUA) em tubos de centrífuga de 1,5 mL, sendo o volume de Trizol posteriormente aumentado para 1 mL. A purificação do RNA foi obtida através da adição de 200 µL de BCP (1-bromo-3-cloropropano, Sigma-Aldrich, EUA), seguida por agitação vigorosa de 15 segundos e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C e a fase superior (500 µL) que contém RNA foi transferida para um novo tubo. O RNA total foi precipitado com a adição de 650 µL de isopropanol por 10 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 4°C por 35 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1,3 mL de etanol 75% (2x), evaporado em temperatura ambiente e ressuscitado em 20 a 50 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion, Carlsbad, CA, EUA). Para garantir a remoção de eventual contaminação de DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase (*kit turboDNA-free*TM, Ambion, Carlsbad, CA, EUA). O DNA foi quantificado previamente e as amostras diluídas para corresponderem a concentrações dentro dos limites de eficiência da Dnase. A seguir, a cada amostra foram adicionados 10% do volume em 10x *Turbo DNase Buffer*, 1 µL de *Turbo DNase*, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, foram acrescentados 10% do volume em reagente de inativação da *DNase*, seguido de 2 minutos de incubação em temperatura ambiente, durante o qual as amostras foram vortexadas 2 a 3 vezes, seguindo-se uma última centrifugação a 10.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo tubo e a concentração e a qualidade do RNA foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, Wilmington, DE, EUA).

Para a obtenção do cDNA, foi realizada a reação de RT-PCR, utilizando 1 µg de RNA, mais 1 µL de oligonucleotídeos randômicos (100 ng/µL), 1 µL de dNTPs (10 mM) em reação com 13 µL de volume final, ajustado com água DEPC. As amostras foram aquecidas a 65°C por 5 minutos e depois incubadas em gelo por 1 minuto,

adicionando-se 4,75 µL de tampão para PCR (5x), 1 µL de DDT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL) e 0,25 µL da enzima *Superscript III* (200 U/µL) (todos da Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), completando um volume final de 20 µL. Após homogeneizar as amostras, estas foram incubadas por 5 minutos a 25°C, 50 minutos a 50°C e por fim 15 minutos a 75°C. O cDNA sintetizado foi utilizado para as reações de PCR quantitativo dos genes de interesse.

Os *primers* específicos para os genes do hormônio inibidor da muda (*CasMIH*) e do receptor de ecdisona (*CasEcR1*) abrangem íntrons e estão apresentados na Tabela 2. Foram baseados em sequências obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), desenhados pelo programa *PrimerBlast* e sintetizados pela IDT (Coralville, IA, EUA). E como normalizador foi utilizado o RNA ribossômico *CasRpl12* (Tabela 2). As reações de PCR quantitativo seguiram o protocolo para o fluoróforo *Syber Green*, onde cada solução independente para cada gene, ou para o normalizador, contém 300 nM dos *primers forward* e *reverse*, KAPA *SYBR® Fast qPCR Mix for iCycler® 2x* (KapaBiosystems, EUA) e H₂O DNaseRNase-free (Ambion, Carlsbad, CA, EUA). Esses ensaios foram realizados em um termociclador *iCycler* (BioRad, CA, EUA) nas seguintes condições: 2 minutos a 50°C, 8:30 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60 °C, 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C, seguido de 80 ciclos de 10 segundos a 55°C, com aumento gradativo de 0,5°C. Esta última etapa foi feita para obter *melting curves* o que possibilita avaliar se houve amplificação de produtos inespecíficos; as curvas ideais devem apresentar apenas um pico que coincide com a queda da fluorescência do poço na temperatura esperada para dissociação do produto específico.

Tabela 2. Sequências e concentrações finais dos primers (referências ou números de acesso no GenBank)

<i>Template</i>	<i>Primers</i>	Concentração final
CasRpl12 (Yednock et al., 2015)	For.: 5'-AATCGCAGTTCATCCTCCAC-3' Rev.: 5'-GAGGCATGGTGCTGAATTTG-3'	300 nM 300 nM
<i>CasEcR1</i> HQ630857.1	For.: 5'-CACGTGTGACAGTCAGTGGA-3' Rev.: 5'-ACCAGAGCCCAACACAAACA-3'	300 nM 300 nM

<i>CasMIH</i> KJ813010.1	For.: 5'-CAGCTTACAAGAGCACCGGA-3' Rev.: 5'-TTTCTGACTGACCGTTGCGT-3'	300 nM 300 nM
-----------------------------	--	------------------

4.5. Efeito da injeção de melatonina sobre a expressão dos genes do hormônio inibidor da muda *CasMIH* e do receptor de ecdisona *CasEcR1*

Foi preparada uma solução estoque de melatonina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 24 mg/mL em etanol 100%, posteriormente diluída 100 x em salina de Pantin com cálcio/magnésio (Tabela 1). Desta solução de trabalho, foram injetados 100 µL por animal, correspondendo a 10^{-7} moles do hormônio (Sainath & Reddy, 2010). Os animais no estágio de intermuda foram injetados na membrana artrodial do 5º pereiópodo, diariamente, às 12:00, durante sete dias. Nos animais controle foi injetado o mesmo volume de salina contendo etanol 1%. Os siris foram crioanestesiados a cada 8 horas, ao longo de 24 horas, com início às 8 horas da manhã do dia seguinte ao último dia de injeção; o pedúnculo óptico e hepatopâncreas foram dissecados e armazenados em freezer -80°C. As etapas de extração, purificação, obtenção de cDNA e as reações de qPCR foram desenvolvidas seguindo o protocolo descrito acima (item 4.4.)

4.6. Análises estatísticas

4.6.1. Análise da concentração de melatonina hemolinfática

Os níveis hemolinfáticos de melatonina dos siris em pré-muda e intermuda foram avaliados ao longo das 24 horas. Para determinar a significância das diferenças entre as concentrações de melatonina ao longo do tempo em cada estágio utilizou-se *two-way* ANOVA com pós-teste de Tukey e para a comparação entre os estágios de muda em cada ponto temporal utilizou-se o *Two-way* ANOVA seguida do pós-teste Bonferroni.

4.6.2. Análise dos dados de PCR quantitativo

O primeiro valor obtido, C_T , é o número de ciclos que se determina passando-se uma reta, denominada limiar, que cruza as porções de crescimento geométrico das curvas de amplificação. Sabendo-se C_T , é encontrado o ΔC_T que é a diferença entre esse valor para cada gene de interesse e o valor de C_T para o normalizador *CasRpl12*. Para obter o $\Delta\Delta C_T$, subtraiu-se o menor valor de expressão do seu respectivo gene, sendo o menor valor de *CasMIH* em intermuda e de *CasEcR1* em pré-muda; já no experimento de injeção de melatonina $\Delta\Delta C_T$ foi obtido subtraindo-se o menor valor obtido no

controle de cada tecido. Para determinar a expressão relativa ao respectivo controle, o valor de $\Delta\Delta C_T$ foi colocado como exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta C_T}$). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM).

Os níveis de significância das possíveis diferenças entre as fases de muda ao longo das 24 horas, ou entre os grupos controle e tratado por melatonina ao longo das 24 horas, foram encontrados comparando-se os resultados de PCR quantitativo em log por *two-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Já para os níveis de significância entre os pontos temporais em um mesmo grupo, os dados logarítmicos foram comparados por *two-way* ANOVA seguida por teste de Tukey.

Nos casos onde a diferença foi visualmente nítida, mas ANOVA não detectou significância estatística, o teste *t* de Student foi realizado e as diferenças significativas estão representadas nos gráficos por asterisco (*). Assumiu-se para todos os testes, $p \leq 0,05$ como probabilidade de rejeição da hipótese nula.

5. RESULTADOS

5.1. Expressão e quantificação das enzimas AANAT e ASMT

Das sequências de artrópodes para a proteína AANAT de *Rattus norvegicus* utilizadas no alinhamento, apenas *Biston betularia* apresentou homologia de cerca de 21% (barra preta), enquanto *Homo sapiens* (AAH92430.1) atingiu 99% de homologia (barra vermelha) (Figura 7). Diante disto, por não haver nenhuma referência para crustáceos, resolvemos fazer os protocolos de imunocitoquímica e imunohistoquímica com o anticorpo policlonal de *Rattus norvegicus*. Os procedimentos tiveram a finalidade de confirmar a presença da via de síntese da melatonina em *C. sapidus*.

Figura 7. Resultado do alinhamento da sequência da proteína AANAT de *Rattus norvegicus* (barra azul) com as do *Homo sapiens* (barra vermelha) e *Biston betularia* (barra preta).

A imunocitoquímica, seguida de citometria de fluxo, foi realizada com células dissociadas do hepatopâncreas de espécimes em 2 estágios do ciclo de muda, ao longo de 24 horas. De fato, em todas as análises foi possível observar a marcação positiva para as duas enzimas avaliadas (Figura 8).

Figura 8. Citometria de fluxo com imagem. Emissão de fluorescência de células de hepatopâncreas marcadas com anticorpos para AANAT e ASMT (FITC/verde). Ch01 e Ch09: campo claro; Ch02: fluorescência; Ch06: auto-fluorescência.

De acordo com os valores de expressão por unidades arbitrárias, os animais em intermuda (Figura 9 A) apresentaram perfil semelhante de oscilação diária para as duas enzimas, com um aparente aumento da emissão de fluorescência no ponto 00 horas, que diminuiu às 16 horas. Em siris em pré-muda, a menor expressão detectada também foi no ponto das 16 horas, porém o pico se deu às 8 horas. A amplitude da emissão de fluorescência da AANAT foi menor se comparada com a ASMT, que apresentou níveis mais altos, chegando a aproximadamente 8000 UA (após dedução do controle negativo) no ponto das 8 horas (Figura 9 B).

Para uma melhor visualização, dois gráficos foram feitos comparando os valores de fluorescência das enzimas, nos dois estágios de muda. A AANAT, em todos os pontos, foi visualmente mais expressa em animais em pré-muda do que em intermuda (Figura 9 C). Já a ASMT estava mais expressa nos animais em pré-muda em relação a intermuda apenas no ponto das 8 horas; às 16 horas, não houve diferença visual na emissão de fluorescência entre os estágios e às 00 horas siris em intermuda apresentaram mais ASMT (Figura 9 D).

Figura 9. Expressão proteica das enzimas AANAT e ASMT em células de hepatopâncreas dissociado. A) Animais em intermuda; B) Animais em pré-muda; C) Comparação entre os estágios na expressão de AANAT; D) Comparação entre os estágios na expressão de ASMT. Os valores estão expressos em unidades arbitrárias de fluorescência (UA) após subtração do controle negativo (no qual o anticorpo primário foi omitido na reação de imunocitoquímica).

Os resultados descritos acima sugerem a presença das enzimas da maquinaria de síntese da melatonina em células dissociadas do hepatopâncreas, porém, os *counts* celulares com marcação positiva para os anticorpos utilizados foram relativamente baixos levando a uma redução da acurácia da técnica para crustáceos. Diante disto, resolvemos testá-los em cortes histológicos dos pedúnculos ópticos, uma vez que, não foi possível realizar sua dissociação. Os cortes foram feitos em toda extensão do pedúnculo óptico, incluindo a retina.

É possível observar na Figura 10 A-D uma marcação que corresponderia às enzimas em questão, quando o fluoróforo FITC foi excitado no comprimento de onda de 525 nm. Porém, cortes seriais do mesmo pedúnculo quando submetidos ao mesmo procedimento na ausência dos anticorpos primários (Figura 10 E, F), ainda mostraram uma aparente marcação, nos levando a crer que existe uma falta de especificidade dos anticorpos para as enzimas de *C. sapidus*.

Figura 10. Expressão proteica das enzimas AANAT e ASMT em cortes de pedúnculo óptico. A) AANAT de animais em intermuda; B) ASMT de animais em intermuda; C) AANAT de animais em pré-muda; D) ASMT de animais em pré-muda; E) Controle negativo (omissão de anticorpo primário) de animais em intermuda; F) Controle negativo (omissão de anticorpo primário) de animais em pré-muda. Cor verde = FITC; azul = DAPI. ME = *Medulla externa*; MI = *Medulla interna*; SG = glândula do seio; RE = retina; XO = órgão X.

5.2. Níveis de melatonina hemolinfática

A melatonina é um hormônio com perfil de oscilação diária, conhecido para várias espécies de invertebrados e vertebrados, mas ainda não havia sido relatado em *C. sapidus*. A Figura 11 mostra que os níveis de melatonina hemolinfáticos de animais em intermuda não variam ao longo do dia; já no grupo em pré-muda, vê-se um perfil de oscilação diária nos níveis desta indolamina com um aumento na concentração na hemolinfa às 8 horas, seguido de uma diminuição contínua até a fase de escuro, atingindo o mínimo às 00 horas. Existe ainda diferença entre os estágios: os animais de pré-muda apresentaram uma concentração mais alta de melatonina na hemolinfa, comparados aos de intermuda, mas esta diferença foi significativa apenas às 8 horas.

Figura 11. Concentração de melatonina na hemolinfa de espécimes de *C. sapidus* em estágios de intermuda e pré-muda (n= 5-7).

5.3. Expressão gênica temporal de *CasEcR1* e *CasMIH*

Além de analisar a variação temporal diária na expressão dos genes relacionados com a muda, o estudo permitiu comparar dois estágios de muda, a intermuda e a pré-muda.

Nos animais em intermuda, o pedúnculo óptico não apresentou uma variação significativa na expressão de *CasEcR1* entre os pontos; *CasMIH* por sua vez teve seu pico de expressão às 8 horas, diminuindo ao longo das 24 horas (Figura 12 A, B). A expressão destes genes no hepatopâncreas de animais em intermuda apresentou perfil oscilatório similar ao visto em pré-muda, com um aumento às 16 horas, porém significativo apenas na pré-muda (Figura 12 C, D).

Nos animais em pré-muda, o pedúnculo óptico apresentou o mesmo perfil de oscilação para *CasEcR1* e *CasMIH* com os menores valores de expressão às 16 horas (Figura 12 A, B); o hepatopâncreas também apresentou o mesmo perfil de oscilação na expressão dos dois genes, porém o pico de expressão foi às 16 horas (Figura 12 C, D). Diante disto, nota-se uma relação de anti-fase na expressão dos genes entre os tecidos, uma vez que os picos de expressão no hepatopâncreas coincidem com as menores expressões no pedúnculo óptico.

Quando comparada a expressão entre os estágios de muda em cada ponto temporal avaliado, a expressão do *CasEcR1* no pedúnculo óptico foi maior em intermuda apenas às 16 horas, nos demais pontos a expressão foi maior em pré-muda (Figura 12 A). Já no hepatopâncreas, apenas o ponto das 08 horas apresentou diferença significativa entre os estágios sendo mais expresso na pré-muda (Figura 12 C). Uma maior expressão de *CasMIH* foi notada no pedúnculo óptico em fase de intermuda nos pontos da fase de claro (8 e 16 horas), mas no escuro (00 horas) esta diferença não foi significativa (Figura 12 B). Ao contrário do hepatopâncreas que, em animais em pré-muda, expressou mais *CasMIH* em relação à intermuda em todos os pontos (Figura 12 D).

Callinectes sapidus - Gene expression

Figura 12. Expressão gênica temporal em estágios de intermuda e pré-muda de (A) *CasEcR1* e (B) *CasMIH* nos pedúnculos ópticos (n=3-7); (C) *CasEcR1* e (D) *CasMIH* em hepatopâncreas (n=3-5). A

expressão gênica foi normalizada por *CasRpl12* e os valores foram expressos relativos ao menor valor de *CasEcR1* em pré-muda (A e C) e de *CasMIH* em intermuda (B e D). Os asteriscos (*) representam diferença estatística revelada por teste *t*.

Uma segunda análise foi feita a fim de demonstrar qual tecido expressava mais de um determinado gene; e para uma melhor visualização, os dados foram analisados, comparando cada gene entre os tecidos nos dois estágios de muda.

Os animais em intermuda apresentaram uma maior expressão de *CasMIH* no pedúnculo óptico em relação ao hepatopâncreas, em todos os pontos temporais (Figura 13 A). Na pré-muda, o pedúnculo óptico manteve uma maior expressão do *CasMIH* em comparação ao hepatopâncreas nos pontos do início da fase de claro e na fase de escuro (8 e 00 horas); no entanto, às 16 horas, não houve diferença de expressão entre os tecidos (Figura 13 C). O *CasEcR1*, por sua vez, foi mais expresso no hepatopâncreas às 16 horas, porém, nos demais pontos não houve diferença na expressão entre os tecidos (Figura 13 B). Na Figura 13 D é possível observar que o hepatopâncreas em pré-muda expressa mais *CasEcR1* em todos os pontos, porém devido à oscilação diária de anti-fase entre os tecidos, onde os horários de maior expressão do pedúnculo (08 e 00 horas) coincidem com os de menor expressão do hepatopâncreas (08 e 00 horas), uma diferença significativa apenas no ponto das 16 horas foi notada.

***Callinectes sapidus* - Gene expression**

Figura 13. Comparação da expressão gênica temporal de *CasMIH* e *CasEcR1* entre o pedúnculo óptico e o hepatopâncreas em cada estágio de muda. (A) *CasMIH* e (B) *CasEcR1* no pedúnculo e hepatopâncreas em animais em intermuda (n=3-7). (C) *CasMIH* e (D) *CasEcR1* no pedúnculo e hepatopâncreas em animais em pré-muda (n=3-5). A expressão gênica foi normalizada por *CasRpl12* e os valores foram expressos relativos ao menor valor de *CasMIH* em intermuda (A e C) e de *CasEcR1* em pré-muda (B e D). Os asteriscos (*) representam diferença estatística demonstrada por teste *t*.

5.4. Influência da melatonina sobre a expressão gênica temporal de *CasEcR1* e *CasMIH*

Em todos os gráficos da Figura 14 é possível observar uma inibição da expressão gênica de *CasEcR1* e *CasMIH* causada pelo tratamento com melatonina, em todos os horários e nos dois tecidos, em comparação aos animais controle.

Nas Figuras 14 A e B, o perfil diário da expressão gênica do pedúnculo óptico dos animais tratados com melatonina foi semelhante para os dois genes, com a menor expressão às 8 horas, aumentando ao longo do dia sendo a maior expressão às 00 horas. Na comparação entre os grupos controle e tratado, a inibição na expressão de *CasEcR1* no pedúnculo óptico foi significativa nos pontos das 16 e 00 horas (Figura 14 A). Enquanto a expressão de *CasMIH* apresentou diferença estatística entre os grupos controle e tratado apenas no ponto 00 horas (Figura 14 B).

O hepatopâncreas do grupo controle apresentou perfil de oscilação diária para a expressão de *CasEcR1*, com o menor nível às 8 horas seguido de um aumento nos pontos 16 e 00 horas; embora com perfil semelhante, esse aumento nos animais tratados não foi significativo, mostrando que melatonina aboliu a variação temporal. Os transcritos de *CasEcR1* do grupo tratado apresentaram uma redução significativa quando comparados com os animais controle, nos pontos das 16 e 00 horas; às 8 horas, a expressão também foi maior no grupo controle, mas a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 14 C). A expressão de *CasMIH* no hepatopâncreas sofreu uma redução nos animais tratados com melatonina em relação aos animais controles, sendo significativa apenas no ponto das 16 horas. Este pico presente nos animais controle foi abolido pelo tratamento com melatonina (Figura 14 D).

Callinectes sapidus - Gene expression

Figura 14. Expressão gênica temporal de *CasEcR1* e *CasMIH* no pedúnculo óptico e hepatopâncreas de animais controles e tratados com 10^{-7} mol de melatonina/siri. (A) *CasEcR1* e (B) *CasMIH* no pedúnculo óptico (n=3-4); (C) *CasEcR1* e (D) *CasMIH* no hepatopâncreas (n=2-4). A expressão gênica foi normalizada por *CasRpl12* e os valores foram expressos relativos ao menor valor do controle de cada análise.

6. DISCUSSÃO

Os estudos sobre a regulação hormonal do ciclo de muda em crustáceos que incluem principalmente os dois hormônios antagônicos, ecdisona e o hormônio inibidor da muda, têm seu foco na variação da expressão gênica e de níveis hemolinfáticos entre os estágios (Chung, 2010; Techa e Chung, 2013; Techa e Chung, 2015), desconsiderando, no entanto, a variação circadiana desses e de outros hormônios. Os ritmos diários ambientais aos quais esses animais são submetidos, como o ciclo de claro e escuro, de temperatura ou o ciclo de marés, certamente influenciam a produção e secreção de hormônios, incluindo os que regulam o ciclo de muda.

A intermuda e a pré-muda compreendem estágios mais longos do ciclo de muda, com duração de 45 a 60 dias e 15 a 20 dias, respectivamente (Kuballa e Elizur, 2007); o que pode ser afetado pelo tamanho e idade do animal ou por manipulação exógena, como a retirada do pedúnculo óptico (Bitner e Kopanda, 1973). Ao longo deste período ocorre variação de alguns hormônios, como por exemplo, a ecdisona que tem seu pico no fim da pré-muda (Chang e Mykles, 2011). Já para a intermuda, poucos estudos na literatura mostram a variação hormonal ao longo deste estágio, devido à sua longa duração; a ausência de um sinal morfológico que indique o sub-estágio em que o animal se encontra na intermuda dificulta essa análise.

A técnica mais comum na identificação dos estágios de muda em cultivo é a cor do 5º par de pereiópodos, que muda de acordo com a proximidade da ecdise (Oesterling, 1995). Porém este método não é o mais adequado quando se quer avaliar a variação de hormônios ao longo dos estágios de muda, já que aquela parece ocorrer diariamente. Devido a isso, um dos próximos passos em nossas futuras investigações, será utilizar a dosagem de ecdisteróides na hemolinfa, já realizada por Chung e colaboradores (2010), o que nos permitirá agrupar os indivíduos em períodos de muda semelhantes dentro de cada estágio e, assim, obter resultados com menor variabilidade.

A melatonina é uma forte candidata a estar envolvida na regulação do ciclo de muda em crustáceos; sua síntese é limitada pela expressão das enzimas da sua via biossintética, AANAT, responsável pela N-acetilação da serotonina e ASMT, que converte a N-acetilserotonina em melatonina (Tan et al., 2014). As células de hepatopâncreas e os cortes histológicos do pedúnculo óptico deste presente estudo apresentaram uma marcação, porém acreditamos ser inespecífica, pois, por mais que a melatonina seja uma molécula ubíqua e idêntica entre todos os grupos e sua via

biossintética seja conservada, as enzimas envolvidas apresentam baixa homologia entre artrópodes e mamíferos, o que certamente interferiu nos resultados obtidos.

A literatura atribui à melatonina diversas funções nos crustáceos, como defesa antioxidante (Maciel et al., 2010; Geihs et al., 2016), regulação dos níveis de glicose na hemolinfa (Sainath e Reddy, 2010a; Maciel et al., 2014), indução de regeneração de membros e regulação positiva do ciclo de muda (Tilden et al., 1997; Sainath e Reddy, 2010b; Girish et al., 2015). Se considerarmos os vertebrados, a luz é um fator inibitório da síntese de melatonina na glândula pineal, mas em crustáceos a literatura não foi capaz de estabelecer um padrão na sua síntese e nos níveis hemolinfáticos deste hormônio que tivesse relação com presença ou ausência de luz.

Em espécimes do lagostim *P. clarkii* mantidos em ciclo de claro e escuro (14:10 LD), o pico de atividade da AANAT às 10 horas precedeu o pico de melatonina que ocorreu no fim da fase de claro (19 horas) (Agapito et al., 1995). Em *U. pugilator*, o maior aumento da atividade dessa enzima ocorreu no final da fase de escuro, sem correspondente síntese do hormônio, porém houve um pico de atividade da enzima, mais discreto, concomitante ao aumento da melatonina às 13 horas (Tilden et al., 2001). Não foi possível demonstrarmos a presença das enzimas da via de síntese de melatonina, pois os anticorpos utilizados para o estudo não reconheceram os antígenos de *C. sapidus*. Porém, os resultados de ELISA da hemolinfa indicam que existe uma variação dos níveis de melatonina ao longo do dia em animais em pré-muda, com o pico no início da fase de claro; já em animais em intermuda não houve variação ao longo do dia.

Em *P. clarkii* (Agapito et al., 1995), *U. pugilator* (Tilden et al., 2001) e *Daphnia magna* (Markowska et al., 2009), o pico de melatonina dá-se na fase de luz. Em *N. granulata*, ocorrem dois picos discretos, sendo um na fase de claro e o outro no fim da fase de escuro (Maciel et al., 2008). É surpreendente que, em nenhum destes artigos, esteja mencionado o estágio do ciclo de muda no qual foram coletados os dados. Apesar desta ressalva, os níveis de melatonina encontrados em nosso estudo estão de acordo com a literatura sobre melatonina em crustáceos. Foi possível observar também que os níveis totais de melatonina na hemolinfa de *C. sapidus* foram maiores em siris em pré-muda, o que corrobora a hipótese de que este hormônio é um possível regulador positivo da muda também para *C. sapidus*.

Na maioria das análises de expressão gênica, o hepatopâncreas apresentou um ritmo único com maior expressão dos dois genes no ponto das 16 horas, exceto para

CasMIH em pré-muda, quando os transcritos foram altos nos pontos de fase clara, com decréscimo na fase escura. O hepatopâncreas é um tecido com função metabólica e no *C. sapidus* é responsável pelo armazenamento de grande parte do cálcio em suas células R (Becker et al., 1974; Zanotto e Weatly, 2002). Os decápodes em geral apresentam alterações no conteúdo do hepatopâncreas ao longo do ciclo de muda, uma vez que o padrão de alimentação é modificado (Marcolin et al., 2008). Na fase de intermuda, os siris alimentam-se ativamente e armazenam reservas energéticas para a fase posterior, a pré-muda, na qual os animais cessam a alimentação e utilizam essas reservas para o processo final do ciclo de muda (Lipcius e Hernkind, 1982).

Diante disto o hepatopâncreas pode ser considerado um órgão importante no ciclo de muda e torna-se alvo dos ecdisteróides que serão responsáveis por essa sinalização. O aumento na expressão de *CasEcR1* no hepatopâncreas em animais em pré-muda comparados com o grupo em intermuda, bem como sua oscilação diária, podem estar relacionados com a função deste tecido na aproximação da ecdise e/ou com o aumento de ecdisteróides na hemolinfa, neste período.

Outro resultado, e desta vez não muito comum, foi a expressão relativamente alta de *CasMIH* no hepatopâncreas. O hormônio inibidor da muda é um neuro-hormônio, da família dos hormônios hiperglicemiantes de crustáceos (CHH), que é predominantemente sintetizado no sistema órgão-X/glândula do seio localizado no pedúnculo óptico, com expressão mais alta na fase de intermuda, cumprindo o seu papel de inibir a muda (Nakatsuji et al., 2009; Chang e Mykles, 2011). Entretanto neste estudo foi possível identificar uma elevada expressão deste neuro-hormônio no hepatopâncreas e, além disso, na fase de pré-muda; conhecida pelos baixos níveis circulantes de MIH.

O hepatopâncreas pode ser responsável por produzir vitelogenina, molécula precursora de vitelo, participando assim da maturação ovariana; e em algumas espécies, ao invés do ovário, ele pode ser considerado o sítio principal de síntese e liberação de vitelogenina (Jayasankar et al., 2002). Estudos como os de Zmora et al. (2009b) e Luo et al. (2015), realizados em fêmeas de *C. sapidus* e *Litopenaeus vannamei*, respectivamente, mostraram que a incubação de células hepatopancreáticas com extratos da glândula do seio, contendo CHH e MIH, ou com recombinantes de isoformas do MIH, aumenta a expressão de vitelogenina pelo hepatopâncreas. Portanto, o MIH pode ter funções na regulação de outros processos fisiológicos locais, o que poderia explicar seu aumento em hepatopâncreas de siris em pré-muda.

Embora o hepatopâncreas tenha expressado *CasMIH*, o pedúnculo óptico não deixou de ser o principal sítio de síntese deste hormônio, apresentando níveis altos tanto na intermuda, quanto na pré-muda. Quase todos os hormônios responsáveis pela inibição de processos fisiológicos são sintetizados pelo órgão X e estocados e liberados pela glândula do seio, incluindo MIH, VIH, MIOH (Hopkins, 2012; Webster et al., 2012). Neste estudo, a expressão gênica temporal de *CasMIH* no pedúnculo óptico está em anti-fase com o receptor da ecdisona (*CasEcR1*) no estágio de intermuda, período do ciclo onde MIH está mais ativo. Portanto pode-se hipotetizar que, se o aumento de *CasEcR1* for decorrente do aumento de ecdisteróides na hemolinfa, esta expressão antagônica diária pode ser responsável pela manutenção do estado fisiológico na intermuda, resultando na inibição do avanço do ciclo em direção à ecdise.

O receptor de ecdisteróides, EcR, forma heterodímero com o receptor nuclear RXR, sendo EcR responsável pela ligação ao seu mensageiro extracelular, enquanto RXR facilita a ligação do heterodímero ao elemento responsivo no DNA. Em 2013, Techa e Chung mostraram o padrão de expressão de *CasEcR* e *CasRXR* no pedúnculo óptico e órgão Y de *C. sapidus* ao longo do ciclo de muda, comprovando a co-expressão desses dois receptores. Posteriormente, os mesmos autores demonstraram que este heterodímero se liga à região promotora do gene *CasMIH* e, portanto, regula sua expressão. Além disso, demonstraram que ecdisteróides em diferentes concentrações aumentam a expressão de *CasMIH* no pedúnculo óptico e que a injeção de um dsRNA de *CasEcR1* inibe a expressão de *CasMIH* no pedúnculo óptico (Techa e Chung, 2015). Diante disto, os dados temporais obtidos neste estudo reforçam a ideia de que há uma relação entre o aumento na expressão do *CasEcR1* e o aumento na expressão do *CasMIH* na pré-muda, uma vez que o perfil oscilatório foi o mesmo.

A injeção diária de melatonina em animais em intermuda teve como objetivo avaliar se sua ação como regulador positivo sobre a muda é exercida sobre os receptores de ecdisteróides ou sobre a produção de MIH. De fato, a melatonina exógena causou a inibição dos genes de interesse em ambos os tecidos, sendo a resposta mais rápida para o *CasEcR1* com diferença significativa às 16 e 00 horas em relação ao controle; já a expressão do *CasMIH* sofreu inibição pelo tratamento às 00 horas no pedúnculo óptico e às 16 horas no hepatopâncreas. Além da inibição, que foi muito mais expressiva no hepatopâncreas para ambos os genes, houve também a perda da oscilação diária dos genes, uma vez que, na presença de melatonina exógena, os valores de expressão temporal não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Este dado de

inibição fortalece a hipótese de que o aumento fisiológico de melatonina em pré-muda, apresentado na Figura 2, leva à indução precoce da muda, exercida pela inibição do receptor de ecdisteróides e repressão da síntese de MIH.

O resultado de inibição do MIH dos animais em intermuda por melatonina exógena nos levou a iniciar um experimento para demonstrar de forma funcional o papel da melatonina sobre a muda. Os siris, desde o 1º dia após a ecdise, estão sendo injetados com melatonina (experimentais) ou salina (controles) a cada 7 dias até a ecdise seguinte. Desta forma será possível corroborar os dados de inibição do MIH com o encurtamento do período de intermuda e consequente redução no tempo de uma ecdise à outra dos animais tratados com melatonina.

Girish e colaboradores (2015) avaliaram o aumento de alguns fatores relacionados a muda e reprodução no hepatopâncreas de *S. serrata* induzido pela melatonina, que fora injetada a cada 7 dias, durante 28 dias. A administração de melatonina exógena aumentou a secreção de ecdisteróides pelo órgão Y e metil farnesoato pelo órgão mandibular, como também, os níveis circulantes destes hormônios. Quanto aos resultados de expressão gênica, o aumento na expressão do receptor de ecdisona (*EcRI*) após tratamento com melatonina exógena foi contrário ao que encontramos no presente estudo. Possivelmente o protocolo de administração da melatonina exógena tenha sido o fator chave para esta divergência, uma vez que avaliamos uma resposta aguda a injeções diárias do hormônio por 7 dias.

Em nossos resultados, além da inibição de *CasMIH* pela melatonina exógena, *CasEcRI* também sofreu inibição pelo tratamento. O estágio de pré-muda é dividido em 4 sub-estágios, onde ocorre o desprendimento do antigo exoesqueleto e a formação da nova cutícula (Kuballa e Elizur, 2007) e a flutuação hormonal dos hormônios de regulação do ciclo (Chang e Mykles, 2011). Em *C. sapidus*, assim como em outras espécies, a concentração de ecdisteróides varia dentro do estágio de pré-muda, com níveis baixos no 1º e 2º estágio (Techa e Chung, 2013), até que ocorre o pico de concentração no 3º sub-estágio, com uma queda posterior, no 4º sub-estágio (Lee et al., 1998). Se a expressão dos receptores de ecdisona for dependente dos níveis de ecdisteróides na hemolinfa, os animais tratados com melatonina exógena podem encontrar-se em um estágio de pré-muda no qual os níveis de ecdisteróides estejam baixos, que pode ser tanto no início da pré-muda ou devido à aproximação da ecdise.

7. AVANÇOS NO CONHECIMENTO E PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo destacam-se pelo pioneirismo do grupo em utilizar técnicas sofisticadas de biologia molecular para compreender um processo fisiológico vital não só para os crustáceos, mas para todos os artrópodes – o ciclo de muda. Além disso, nosso estudo expande a literatura vigente sobre os efeitos da melatonina – a qual é amplamente estudada em vertebrados – para uma espécie de invertebrado, trazendo assim uma grande contribuição para o avanço da fisiologia endócrina comparada, evidenciando a conservação das moléculas biológicas tanto sob o ponto de vista estrutural quanto funcional.

Os crustáceos em especial, além de constituírem um grupo de morfologia e fisiologia complexas, também possuem importância econômica, uma vez que são iguaria em diversos países do mundo. De fato, o nosso estudo tem um potencial econômico direto, pois a aplicação dos conhecimentos encontrados neste trabalho pode levar a um aprimoramento do cultivo e manejo deste crustáceo. O entendimento da regulação do ciclo de muda, tanto por fatores endógenos, já amplamente conhecidos como os ecdisteróides, MIH, MF e, mais recentemente a melatonina – sendo a primeira vez demonstrada em *C. sapidus* no presente estudo –, quanto por fatores abióticos, como luz, temperatura e salinidade, fazem parte de possível e potencial refinamento desse tipo de cultivo.

Uma outra importante descoberta do presente estudo é o perfil de oscilação circadiana que os genes relacionados com o ciclo de muda e também os níveis de melatonina circulante apresentam. Diante destes novos achados, nos perguntamos: quais possíveis *inputs* para a manutenção do ritmo desses genes? Assim como os genes estudados, os hormônios relacionados com a muda também apresentam uma oscilação diária? Se sim, é possível modular estes ritmos para um processo de muda mais rápido? Qual o mecanismo de acoplamento dos fatores ambientais e endógenos e como estes afetam o cultivo desta espécie? Logo, entender como as pistas ambientais regulam fatores endógenos que influenciam no ciclo de muda será alvo de nossa próxima etapa de pesquisa. Diante do exposto, esse estudo trouxe uma grande contribuição para o campo vigente, pois através do emprego de técnicas de biologia molecular, importantes fenômenos biológicos foram descobertos, os quais podem impactar diretamente o cultivo e manejo deste crustáceo, além de claro terem contribuído para o avanço da fisiologia endócrina comparada.

8. CONCLUSÕES

- Melatonina foi detectada na hemolinfa de *C. sapidus* nos estágios avaliados;
- Os níveis totais de melatonina na hemolinfa de *C. sapidus* foram maiores em animais em pré-muda, e exibiram um perfil de oscilação ao longo do dia com um pico de concentração às 8 horas, quando comparado a siris em intermuda;
- Não foi possível demonstrar a presença das enzimas AANAT e ASMT da via de síntese de melatonina nos órgãos estudados, pedúnculo óptico e hepatopâncreas, devido à inespecificidade dos anticorpos de *R. novergicus* para *C. sapidus*;
- Os fatores relacionados ao ciclo de muda *CasMIH* e *CasEcR1* apresentaram uma oscilação diária na expressão de seus genes. No hepatopâncreas, os dois genes oscilaram com perfil semelhante, independente do estágio de muda, apresentando maior expressão às 16 horas; já o pedúnculo óptico teve o mesmo perfil de oscilação para os dois genes na pré-muda com uma menor expressão às 16 horas, mas na intermuda eles oscilaram em anti-fase.
- A melatonina tem influência sobre os fatores envolvidos no ciclo de muda examinados neste estudo, pois o hormônio exógeno inibiu a expressão de *CasMIH* e *CasEcR1* tanto no pedúnculo óptico, quanto no hepatopâncreas.

9. REFERÊNCIAS

- Abello P.; Warman C.G.; Naylor E. Circatidal moulting rhythm in the shore crab *Carcinus maenas*. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 77, pp. 277-280, 1997.
- Acuña-Castroviejo D.; Escames G.; Venegas C.; Díaz-Casado M. E.; Lima-Cabello E.; López L. C.; Rosales-Corral.; Tan D-X.; Reiter R. J. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, i. 16, pp. 2997-3025, 2014.
- Agapito M. T.; Herrero B.; Pablos M. I.; Miguel J. L.; Recio J. M. Circadian rhythms of melatonin and serotonin-*N*-acetyltransferase activity in *Procambarus clarki*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 112, n. 1, pp. 179-185, 1995.
- Aktas M.; Kumlu M.; Eroldogan O. T. Off-season maturation and spawning of *Penaeus semisulcatus* by eyestalk ablation and/or temperature – photoperiod regimes. **Aquaculture**, v. 228, pp. 361-370, 2003.
- Allegra M.; Reiter R. J.; Tan D-X.; Gentile C.; Tesoriere L.; Livrea M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal Pineal Research**, v. 34, pp. 1-10, 2003.
- Becker G. L.; Chen C-H.; Greenawalt J. W.; Lehninger A. L. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. **The Journal of Cell Biology**, v. 61, pp. 316-326, 1974.
- Bittner G. D.; Kopanda R. Factors influencing molting in the crayfish *Procambarus clarki*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 186, pp. 7-16, 1973.
- Borst D. W.; Ogan J.; Tsukimura B.; Claerhout T.; Holford K. C. Regulation of the crustacean mandibular organ. **American Zoologist**, v. 41, pp. 430-441, 2001.
- Brydon L.; Roka F.; Petit L.; Coppet P.; Tissot M.; Barret P.; Morgan P. J.; Nanoff C.; Strosberg A. D.; Jockers R. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G_{i2}, G_{i3}, and G_{q/11} proteins. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 12, pp. 2025-2038, 1999.
- Cadman L. R.; Weinstein M. P. Effects of temperature and salinity on the growth of laboratory-reared juvenile blue crabs *Callinectes sapidus* Rathbun. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 121, pp. 193-207, 1988.
- Cameron J. N. Post-moult calcification in the blue crab, *Callinectes sapidus*: timing and mechanism. **The Journal of Experimental Biology**, v. 143, pp. 285-304, 1989.

- Carrilo-Vico A.; Guerrero J. M.; Lardone P. J.; Reiter R. J. A review of the multiple actions of melatonin on the immune system. **Endocrine**, vol. 27, n. 2, pp. 189-200, 2005.
- Cary G. A.; Cuttler A. S.; Duda K. A.; Kusema E. T.; Myers J. A.; Tilden A. R. Melatonin: neuritogenesis and neuroprotective effects in crustacean X-organ cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 161, pp. 355-360, 2012.
- Ceinos R. M.; Chansard M.; Revel F.; Calgari C.; Míguez J. M.; Simonneaux V. Analysis of adrenergic regulation of melatonin synthesis in Siberian Hamster pineal emphasizes the role of HIOMT. **NeuroSignals**, v. 13, pp. 308-317, 2004.
- Chang E. S. Hormonal control of moulting in Decapod Crustacea. **American Zoologist**, v. 25, n. 1, pp. 179-185, 1985.
- Chang E. S. Physiological and biochemical changes during the molt cycle in decapod crustaceans: an overview. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 193, pp. 1-14, 1995.
- Chang E. S.; Mykles D. L. Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives. **General and Comparative Endocrinology**, v. 172, pp. 323-330, 2011.
- Chang Y-J.; Sun C-L.; Chen Y.; Yeh S-Z. Modeling the growth of crustacean species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, pp. 157-187, 2012.
- Chaves A. R. Effects of sinus gland extract on mandibular organ size and methyl farnesoate synthesis in the crawfish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 128, pp. 327-333, 2001.
- Chen H-Y.; Watson R.D. Changes in intracellular calcium concentration in crustacean (*Callinectes sapidus*) Y-organs: relation to the hemolymphatic ecdysteroid titer. **Journal of Experimental Zoology**, v. 315, pp. 56-60, 2011.
- Chen H-Y.; Dillaman R. M.; Roer R. D.; Watson R. D. Stage-specific changes in calcium concentration in crustacean (*Callinectes sapidus*) Y-organs during a natural molting cycle, and their relation to the hemolymphatic ecdysteroid titer. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 163, pp. 170-173, 2012.
- Chung J. S. Hemolymph ecdysteroids during the last three moult cycles of the blue crab, *Callinectes sapidus*: quantitative and qualitative analyses and regulation. **Archives of Insects Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 1, pp. 1-13, 2010.
- Cipolla-Neto J.; Amaral F. G.; Afeche S. C.; Tan D. X.; Reiter R. J. Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. **Journal Pineal Research**, v. 56, pp. 371-381, 2014.
- Christie A. E.; Stemmler E. A.; Dickinson P. S. Crustacean neuropeptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, pp. 4135-4169, 2010.

- Dardente H. Melatonin-dependent timing of seasonal reproduction by the *pars tuberalis*: pivotal roles for long daylengths and thyroid hormones. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 2, pp. 249-266, 2012.
- Dong C.; Bai S.; Du L. Temperature regulates circadian rhythms of immune responses in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Fish & Selfish Immunology**, v. 45, pp. 641-647, 2015.
- Dubofsky-Porter E. A.; Chabot C. C.; Watson Iii W. H. Entrainment of juvenile horseshoe crab activity to artificial tides. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, v. 50, i. 2, 125-140, 2017.
- Freeman J. A.; Kilgus G.; Laurendeau D.; Perry H. M. Postmolt and intermolt molt cycles stages of *Callinectes sapidus*. **Aquaculture**, v. 61, pp. 201-209, 1987.
- Galano A.; Tan D. X.; Reiter R. J. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. **Journal Pineal Research**, v. 51, pp. 1-16, 2011.
- Geihs, M. A.; Vargas, M. A.; Maciel, F. E.; Caldas S. S.; Cruz, B. P.; Primel E. G.; Monserrat J. M.; Nery, L. E. M. Effect of melatonin in antioxidant defense system in the locomotor muscles of the estuarine crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Brachyura). **General and Comparative Endocrinology**, v. 166, pp. 72-82, 2010.
- Geihs, M. A.; Vargas, M. A.; Maciel, F. E.; Vakkuri, O.; Meyer-Rochow, V. B.; Allodi, S.; Nery, L. E. M. Effects of hypoxia and reoxygenation on the antioxidant defense system of the locomotor muscle of the crab *Neohelice granulata* (Decapoda, Varunidae). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 186, pp. 569-579, 2016.
- Girish B. P.; Swetha Ch.; Reddy P. S. Induction of ecdysteroidogenesis, methyl farnesoate synthesis and expression of ecdysteroid receptor and retinoid X receptor in the hepatopancreas and ovary of the giant mud crab, *Scylla serrata* by melatonin. **General and Comparative Endocrinology**, v. 217-218, pp. 37-42, 2015.
- Gong J.; Yu K.; Shu L.; Ye H.; Li S.; Zeng C. Evaluating the effects of temperature, salinity, starvation, and autonomy on molting success, molting interval and expression of ecdysone receptor in early juvenile mud crab, *Scylla paramamosain*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 464, pp. 11-17, 2015.
- Guo B.; Wang F.; Dong S.; Zhong D. Effect of fluctuating light intensity on molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 330-333, pp. 106-110, 2012a.

- Guo B.; Mu Y.; Wang F.; Dong S. Effect of periodic light color change on molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 362-363, pp. 67-71, 2012b.
- Guo B.; Wang F.; Li Y.; Dong S. Effect of periodic light intensity change on molting frequency and growth of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 396-399, pp. 66-70, 2013.
- Hardeland R.; Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. **Journal Pineal Research**, v. 34, pp. 233-241, 2003.
- Havens K. J.; Mcconaugha J. R. Molting in the mature female blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. **Bulletin of Marine Science**, v. 46, n. 1, pp. 37-47, 1990.
- Hensi M. A.; Shabanipour N.; Atabati A.; Bitaraf A. Influence of eyestalk ablation and temperature on molting and mortality of Narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 8, pp. 219-223, 2008.
- Hill R. J.; Billas I. M. L.; Bonneton F.; Graham L. D.; Lawrence M. C. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. **Annual Review Entomology**, v. 58, pp. 251-271, 2013.
- Hines A. H.; Lipcius R.N.; Haddon A. M. Population dynamics and habitat partitioning by size, sex and molt, stage of blue crabs *Callinectes sapidus* in a subestuary of central Chesapeake Bay. **Marine Ecology**, v. 35, pp. 55-64, 1987.
- Hinsch G. W. Fine structural changes in the mandibular gland of the male spider crab, *Libinia emarginata* following eyestalk ablation. **Journal of Morphology**, v. 154, pp. 307-316, 1977.
- Hopkins P. M. The eyes have it: a brief history of crustacean neuroendocrinology. **General and Comparative Endocrinology**, v.175, pp. 357-366, 2011.
- Jayansakar V.; Tsuitsui N.; Jasmani S.; Saido-Sakanaka H.; Yang W.; Okuno A.; Hien T. T.; Aida K.; Wilder M. N. Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, pp. 675-682, 2002.
- Katayama H. Structure-activity relationship of crustacean peptide hormones. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 4, pp. 633-641, 2016.
- Kuballa A.; Elizur A. Novel molecular approach to study moulting in crustaceans. **Bulletin of Fisheries Research Agency**, v. 20, pp. 53-57, 2007.

- Lachaise F.; Le Roux M. A.; Hubert M.; Lafont R. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). **Journal of Crustacean Biology**, v. 13, n. 2, pp. 198-234, 1993.
- Lee K. J.; Watson R. D.; Roer R.D. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 249, pp. 624-627, 1998.
- Lima G. V.; Oshiro L. M. Y. Crescimento somático do caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) em laboratório. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 96, n. 4, pp. 467-472, 2006.
- Lipcius R. N.; Herrnkind W. F. Molt cycle alterations in behavior, feeding and diel rhythms of a decapod crustacean, the spiny lobster *Panulirus argus*. **Marine Biology**, v. 68, pp. 241-252, 1982.
- Luo X.; Chen T.; Zhong M.; Jiang X.; Zhang L.; Ren C.; Hu C. Differential regulation of hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression by two putative molt-inhibiting hormones (MIH1/2) in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Peptides**, v. 68, pp. 58-63, 2015.
- Maciel, F. E.; Geihs, M. A.; Vargas, M. A.; Cruz, B. P.; Ramos, B. P.; Vakkuri, O.; Meyer-Rochow, V. B.; Nery, L. E. M.; Allodi, S. Daily variation of melatonin content in the optic lobes of the crab *Neohelice granulata*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 149A, pp. 162–166, 2008.
- Maciel, F. E.; Ramos, B. P.; Geihs, M. A.; Vargas, M. A.; Cruz, B. P.; Meyer-Rochow, V. B.; Vakkuri, O.; Allodi, S.; Monserrat J. M.; Nery, L. E. M. Effects of melatonin in connection with the antioxidant defense system in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 165, pp. 229-236, 2010.
- Maciel, F. E.; Geihs, M. A.; Cruz, B. P.; Vargas, M. A.; Allodi, S.; Marins L.F.; Nery, L. E. M. Melatonin as a signaling molecule for metabolism regulation in response to hypoxia in the crab *Neohelice granulata*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, pp. 22405-22420, 2014.
- Mackenzie R. S.; Melan M. A.; Passey D. K.; Witt-Enderby P. A. Dual coupling of MT (1) and MT (2) melatonin receptors to cyclic AMP and phosphoinositide signal transduction cascades and their regulation following melatonin exposure. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 4, pp. 587-595, 2002.
- Marcolin C. R.; Carqueija C. R. G.; Tozetto S. O.; Oliveira D. C.; Corrêa A. M. A. Alterações morfológicas do hepatopâncreas de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763)

- (Crustacea, Decapoda, Ocypodidae) em relação aos estádios de intermuda e pré-muda inicial. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 10, n. 2, pp. 97-104, 2008.
- Markowska M.; Bentkowski P.; Kloc M.; Pijanowska J. Presence of melatonin in *Daphnia magna*. **Journal of Pineal Research**, v. 46, pp. 242-244, 2009.
- Markus R. P.; Ferreira Z. S. The immune-pineal axis: the role of pineal and extra-pineal melatonin in modulating inflammation. **Advances in Neuroimmune Biology**, v. I, pp. 95-104, 2011.
- Mattson M. P.; Spaziani E. Cyclic AMP mediates the negative regulation of Y-organ ecdysteroid production. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 42, pp. 185-189, 1985.
- Mattson M. P.; Spaziani E. Regulation of crab Y-organ steroidogenesis in vitro: evidence that ecdysteroid production increases through activation of cAMP-phosphodiesterase by calcium-calmodulin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 48, pp. 135-151, 1986.
- Melo G. A. S. Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do litoral brasileiro. **São Paulo, Plêiade/Fapesp**, 604 p., 1996.
- Mykles D. L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 127, pp. 196-203, 2011.
- Nagaraju G. P. C.; Reddy P. R.; Reddy P. S. *In vitro* methyl farnesoate secretion by mandibular organs isolated from different molt and reproductive stages of the crab *Oziotelphusa senex senex*. **Fisheries Science**, v. 72, pp. 410-414, 2006.
- Nagaraju G. P. C. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? **Aquaculture**, v. 272, pp. 39-54, 2007.
- Nagaraju G. P. C. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview. **The Journal of Experimental Biology**, v. 214, pp. 3-16, 2011.
- Nakatsuji T.; Keino H.; Tamura K.; Yoshimura S.; Kawakami T.; Aimoto S.; Sonobe H. Changes in the amounts of the molt-inhibiting hormone in sinus gland during the molt cycle of the American crayfish, *Procambarus clarkii*. **Zoological Science**, v. 17, pp. 1129-1136, 2000.
- Nakatsuji T.; Sonobe H. Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 135, pp. 358-364, 2004.
- Nakatsuji, T.; Han, D.-W.; Jablonsky, M.J.; Harville, S.R.; Muccio, D.D.; Watson, R.D. Expression of crustacean (*Callinectes sapidus*) molt-inhibiting hormone in *Escherichia*

- coli*: characterization of the recombinant peptide and assessment of its effects on cellular signaling pathways in Y-organs. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 253, pp. 96–104, 2006a.
- Nakatsuji, T., Sonobe, H., Watson, R.D. Molt-inhibiting hormone mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase. **Molecular Cellular Endocrinology**, v. 253, pp. 76–82, 2006b.
- Nakatsuji T.; Lee C-Y.; Watson R. D. Crustacean molt-inhibiting hormone: structure, function, and cellular mode of action. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 152, pp. 139-148, 2009.
- Nery L. E. M.; Castrucci A. M. L. Pigment cell signalling for physiological color change. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 118, n. 4, pp. 1135-1144, 1997.
- Nery L. E. M.; Castrucci A. M. L. Crustacean chromatophore: endocrine regulation and intracellular signalling systems. **The Crustacean Nervous System**, pp. 98-112, 2002.
- Neto M. E. A.; Freire A. G. Avaliação de consumo alimentar e textura do exoesqueleto do camarão marinho *Litopenaus vannamei* (Crustacea, Penaeidae) em cultivo comercial, durante o ciclo de muda. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 33, n. 2, pp.147-156, 2007.
- Nosjean O.; Nicolas J-P.; Klupsch F.; Delagrange P.; Canet E.; Boutin J. A. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, pp. 1369-1379, 2011.
- Oesterling M. J. Manual for handling and shedding blue crabs (*Callinectes sapidus*). **Virginia Sea Grant Program**, n. 271, pp. 1-91, 1995.
- Ortega P.; Sá M. G.; Custódio M. R.; Zanotto F. P. Separation and viability of gill and hepatopancreatic cells of a mangrove crab *Ucides cordatus*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, v. 47, pp. 346-349, 2011.
- Perry H.; Trigg C.; Larsen K.; Freeman J.; Erickson M.; Henry R. Calcium concentration in seawater and exoskeletal calcification in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Aquaculture**, v. 198, pp. 197-208, 2001.
- Pervaiz P. A.; Sudan M.; Manohar S. Studies on the effect of photoperiodism and temperature on moulting of a freshwater prawn *Macrobrachium dayanum*. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 3, n. 1, pp. 325-328, 2015.
- Philppen M. K.; Webster S. G.; Chung S.; Dirksen H. Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph. **The Journal of Experimental Biology**, v. 203, pp. 521-536, 2000.

- Pires-Lapa M. A.; Tamura E. K.; Salustiano E. M. A.; Markus R. P. Melatonin synthesis in human colostrum mononuclear cells enhances dectin-1-mediated phagocytosis by mononuclear cells. **Journal of Pineal Research**, v. 55, pp. 240-246, 2013.
- Quackenbush L. S. Crustacean endocrinology, a review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 43, n. 11, pp. 2271-2282, 1986.
- Reddy P. R.; Nagaraju G. P. C.; Reddy P. S. Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, n. 3, pp. 511-515, 2004.
- Reiter R. J.; Tan D-X.; Manchester L. C.; Paredes S. D.; Mayo J. C.; Sainz R. M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**, v. 81, i. 3, pp. 445-456, 2009.
- Reiter R. J.; Tan D. X.; Galano A. Melatonin: Exceeding expectations. **Physiology**, v. 29, pp. 325-333, 2014.
- Rice P. R.; Armitage K. B. The influence of photoperiod on process associated with molting and reproduction in the crayfish *Orconectes nais* (Faxon). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v. 47, pp. 243-259, 1974.
- Rodrigues M. A.; D'Incao F. Comparação do crescimento entre *Callinectes sapidus* (Crustacea, Decapoda, Portunidae) coletados em campo e mantidos em condições controladas. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 98, n. 3, pp. 372-378, 2008.
- Roer R.; Dillaman R. The structure and calcification of the crustacean cuticle. **American Zoologist**, v. 24, pp. 893-909, 1984.
- Roopin M.; Levy O. Melatonin distribution reveals clues to its biological significance in basal metazoans. **PlosOne**, 7(12): e52266, 2012.
- Sá M. G.; Baptista B. B.; Farah L. S.; Leite V. P.; Zanotto F. P. Calcium transport and homeostasis in gill cells of a freshwater crab *Dilocarcinus pagei*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 180, pp. 313-321, 2010.
- Sainath S. B.; Reddy P. S. Melatonergic regulation of hemolymph sugar levels in the freshwater edible crab, *Oziothelphusa senex senex*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 313A, pp. 201-208, 2010a.
- Sainath S. B.; Reddy P. S. Evidence for the involvement of selected biogenic amines (serotonin and melatonin) in the regulation of molting of the edible crab, *Oziothelphusa senex senex* Fabricius. **Aquaculture**, v. 302, pp. 261-264, 2010b.
- Sainath S. B.; Swetha Ch.; Reddy P. S. What do we (need to) know about the melatonin in crustaceans? **Journal of Experimental Zoology**, v. 319A, pp. 365-377, 2013.

- Shinozaki-Mendes R. A.; Manghi R. F.; Lessa R. Comparative study of the molting cycle of wild and reared swimming crabs *Callinectes danae* (Crustacea, Portunidae). **Journal of Applied Ichthyology**, v. 30, i. 3, pp. 1-5, 2013.
- Slominski R. M.; Reiter R. J.; Schlabritz-Loutsevitch N.; Ostrom R. S.; Slominski A. T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, pp. 152-166, 2012.
- Snyder M. J.; Chang E. S. Ecdysteroids in relation to the molt cycle of the American lobster, *Homarus americanus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 81, pp. 133-145, 1991.
- Snyder M. J.; Chang E. S. Role of the midgut gland in metabolism and excretion of ecdysteroids by lobsters, *Homarus americanus*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 85, pp. 286-296, 1992.
- Stoner A. W.; Copeman L. A.; Ottmar M. L. Molting, growth, and energetics of newly-settled blue king crab: Effects of temperature and comparisons with red king crab. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 442, pp. 10-21, 2013.
- Subramoniam T. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. **Fisheries Science**, v. 77, pp. 1-21, 2011.
- Tamone S. L.; Chang E. S. Methyl farnesoate stimulates ecdysteroid secretion from crab Y-organs *in vitro*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 89, pp. 425-432, 1993.
- Tan D-X.; Zeng X.; Kong J.; Manchester L. C.; Hardeland R.; Kim S. J.; Xu X.; Reiter R. J. Fundamental issues related to the origin of melatonin and melatonin isomers during evolution: relation to their biological functions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, pp. 15858-15890, 2014.
- Tan D-X.; Hardeland R.; Back K.; Manchester L. C.; Alatorre-Jimenez M. A.; Reiter R. J. On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. **Journal of Pineal Research**, v. 61, i. 1, pp. 27-40, 2016.
- Taylor J. R. A.; Hebrank J.; Kier W.M. Mechanical properties of the rigid and hydrostatic skeletons of molting blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun. **The Journal of Experimental Biology**, v. 210, pp. 4272-4278, 2007.
- Techa S.; Chung J. S. Ecdysone and retinoid-X receptors of the blue crab *Callinectes sapidus*: Cloning and their expression patterns in eyestalks and Y-organs during the molt cycle. **Gene**, v. 527, pp. 139-153, 2013.

- Techa S.; Chung J. S. Ecdysteroids regulate the levels of molting-inhibiting hormone (*MIH*) expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. **Plos One**, 10(4): e0117278, 2015.
- Tilden, A. R.; Rasmussen, P.; Awantang, R. M.; Furlan, S.; Goldstein, J.; Palsgrove, M.; Sauer, A. Melatonin cycle in the fiddler crab *Uca pugilator* and influence of melatonin on limb regeneration. **Journal of Pineal Research**, v. 23, pp. 142–147, 1997.
- Tilden, A. R.; Alt, J.; Brummer, K.; Groth, R.; Herwig, K.; Wilson, A.; Wilson, S. Influence of photoperiod on N-acetyltransferase activity and melatonin in the fiddler crab *Uca pugilator*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 122, pp. 233–237, 2001.
- Venegas C.; García J. A.; Escames G.; Ortiz F.; López A.; Doerrier C.; García-Corzo L.; López L. C.; Reiter R. J.; Acuña-Castroviejo D. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v. 52, i. 2, pp. 217-227, 2012.
- Vivien-Roels B.; Pévet P. Melatonin: presence and formation in invertebrates. **Experientia**, v. 49, pp. 642-647, 1993.
- Webster S. G.; Keller R.; Dirksen H. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, v. 175, pp. 217-233, 2012.
- Williams D. R.; Fisher M. J.; Rees H. H. Characterization of ecdysteroid 26-hydroxylase: An enzyme involved in molting hormone inactivation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 376, n. 2, pp. 389-398, 2000.
- Witt-Enderby P. A.; Bennet J.; Jarzynka M. J.; Firestine S.; Melan M. A. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. **Life Sciences**, v. 72, pp. 2183-2198, 2003.
- Wu S.; Refinetti R.; Kok L. T.; Youngman R. R.; Reddy G. V. P.; Xue F-S. Photoperiod and temperature effects on the adult eclosion and mating rhythms in *Pseudopidorus fasciata* (Lepidoptera: Zygaenidae). **Environmental Entomology**, v. 43, n. 6, pp. 1650-1655, 2014.
- Yednock B. K.; Sullivan T. J.; Neigel J. E. *De novo* assembly of a transcriptome from juvenile crabs (*Callinectes sapidus*) following exposure to surrogate Macondo crude oil. **BioMed Central Genomics**, v. 16, pp. 1-15, 2015.
- Zanotto F. P.; Wheatly M. G. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects and physiological regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 133, i 3, pp. 645-660, 2002.

- Zeng J.; Nakatsuji T.; Roer R. D.; Watson R. D. Studies of a receptor guanylyl cyclase cloned from Y-organs of the blue crab (*Callinectes sapidus*), and its possible functional link to ecdysteroidogenesis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, pp. 780-788, 2008.
- Zlotos D. P.; Jockers R.; Cecon E.; Rivara S.; Witt-Enderby P. A. MT₁ and MT₂ melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, pp. 3161-3185, 2014.
- Zmora N.; Trant J.; Zohar Y.; Chung J. S. Molt-inhibiting hormone stimulates vitellogenesis at advanced ovarian developmental stages in the female blue crab, *Callinectes sapidus* I: An ovarian stage dependent involvement. **Saline Systems**, v. 5, n. 7, pp. 1-11, 2009a.
- Zmora N.; Sagi A.; Zohar Y.; Chung J. S. Molt-inhibiting hormone stimulates vitellogenesis at advanced ovarian developmental stages in the female blue crab, *Callinectes sapidus* 2: Novel specific binding sites in hepatopancreas and cAMP as a second messenger. **Saline Systems**, v. 5, n. 6, pp. 1-11, 2009b.