



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



DANIELA DANTAS DAVID

**Efeito da temperatura em aspectos neuroendócrinos do
ciclo de muda do siri-azul *Callinectes sapidus*
(BRACHYURA:PORTUNIDAE)**

**Effect of temperature on neuroendocrine aspects of the
molt cycle in the blue crab *Callinectes sapidus*
(BRACHYURA:PORTUNIDAE)**



**São Paulo
2023**

Daniela Dantas David

VERSÃO CORRIGIDA

Efeito da temperatura em aspectos neuroendócrinos do ciclo de muda do siri-azul

***Callinectes sapidus* (BRACHYURA:PORTUNIDAE)**

Effect of temperature on neuroendocrine aspects of the molt cycle in the blue crab

Callinectes sapidus (BRACHYURA:PORTUNIDAE)

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Lauro Castrucci

**São Paulo
2023**

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

David, Daniela Dantas
Efeito da temperatura no siri-azul *Callinectes
sapidus* (BRACHYURA:PORTUNIDAE): aspectos
fisiológicos, moleculares e proteômicos / David
Daniela Dantas ; orientadora Castrucci Ana Maria de
Lauro -- São Paulo, 2023.
119 p.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Ciências Biológicas
(Fisiologia).

1. Siri-azul. 2. Temperatura. 3. Órgãos
Neuroendócrinos. 4. Hormônios. 5. Proteínas. I.
Castrucci, Ana Maria de Lauro, orient. Título.

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



Daniela Dantas David

Efeito da temperatura em aspectos neuroendócrinos do ciclo de muda do siri-azul

***Callinectes sapidus* (BRACHYURA:PORTUNIDAE)**

Effect of temperature on neuroendocrine aspects of the molt cycle in the blue crab

Callinectes sapidus (BRACHYURA:PORTUNIDAE)

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra Ana Maria L. Castrucci.

São Paulo, ___/___/_____

*A todos que não soltaram minha mão durante todos esses anos.
Especialmente a minha mãe, Maria José Davi de
Melo que se fez presente ao meu lado,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Conseguimos! Sim, conseguimos. Falo no plural, pois sem o apoio de cada um que vou citar aqui, eu não teria sido capaz.

Começo esse momento agradecendo a minha mãe, Maria José, por ter me encorajado a permanecer nessa jornada todos os dias e agradecer todo o esforço que fez para estar ao meu lado e me manter forte depois de um turbilhão de coisas que aconteceram nesses últimos anos. Ao meu pai, Sebastião por ter sido tão presente mesmo estando a quilômetros de distância, sua preocupação, atenção e amor foram e sempre serão essenciais para mim. À minha irmã Bianca, que não tem ideia de que o orgulho que ela sente de mim, não é metade do quanto eu tenho dela, te amo incondicionalmente e obrigada sempre pelo presente que colocou nas nossas vidas, o Luquinhas. Aos demais familiares, - em especial Suzana e Thaynnara - obrigada por todas as nossas conversas que me fazem lembrar sempre o quanto vocês me fazem feliz, muito obrigada por acreditarem!

À minha orientadora, Ana Castrucci, minha mãe científica. Obrigada por todo apoio profissional e pessoal que me deu durante todos esses anos, por sempre acreditar no meu potencial, que me fez diversas vezes ganhar forças para continuar. A carreira acadêmica/científica tem muitos desafios, mas sua resiliência comigo e com todos do laboratório era um exemplo diário de que fazer ciência é incrível e vale muito a pena.

Obrigada do fundo do meu coração por tudo!

Ao pós-doc Thalles Lacerda, a quem devo muitos agradecimentos. Obrigada por todas as conversas diárias e a contribuição valiosa na minha pesquisa, você veio para somar.

Muito obrigada!

A todos os colegas de laboratório que dividiram todas as emoções possíveis vividas ao longo desses anos no LabCastrucci, Nathália, Assis, Neto, Giovanna, Toni, Cristhian, Sabrina, Guilherme, Miriane, Letícia Menezes, Letícia Marinho, muito obrigada pelo apoio diário. A Seu Moacir e o Márcio pelas divertidas viagens de campo em busca dos meus siris e a pescadora Denise que se tornou colaboradora essencial no meu projeto, obrigada.

Agradeço aos colegas e professores do departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências (USP) pelo apoio na execução de técnicas e empréstimo de equipamentos.

Às agências de fomento FAPESP (2018/23043-0), CAPES E CNPq pelo auxílio financeiro essencial para o desenvolvimento do projeto.

E para finalizar gostaria de agradecer aqueles que estiveram nos bastidores da vida real, amigos e irmãos que São Paulo me deu. Welder obrigada por existir na minha vida, não sei o que seria de mim nessa cidade sem você ao meu lado, te amo irmão. A Neto e Kass, colegas de apartamento, profissão, sócios, AMIGOS, obrigada por todo apoio de sempre, amo vocês e já estou com saudades. Andrey obrigada pelos dias de almoço seguidos de episódios de preguiça que me fazem tão bem, e Gi obrigada por ser tão parceira em tudo, na vida e na profissão.

À minhas amigas pessoenses, Jessyca e Nathalia, mulheres incríveis que são suporte diário para mim. Nos conectamos por nossos ideais e tenho certeza de que nossa amizade será para sempre.

Aos demais amigos que fizeram e fazem meus dias felizes, Toni, Will, Sara, Thiago, Manoel, Ronny, Daniel, Talles, Carol, Marlina, Ximena amo muito vocês.

Chego ao fim dos meus agradecimentos com mais certeza de que não somos nada sozinhos e que sou rodeada de pessoas maravilhosas que fazem tudo ser muito melhor.

Obrigada Deus pela permissão de todas as coisas.

RESUMO

Pistas ambientais, como a temperatura, podem gerar mudanças em processos fisiológicos de crustáceos, como por exemplo o ciclo de muda. O processo de muda é um evento cíclico subdividido em 5 principais estágios e cada um deles apresenta características distintas que levam a respostas fisiológicas específicas durante este ciclo. Esse processo é regulado majoritariamente por hormônios produzidos no complexo neuroendócrino, órgão-X/ glândula do seio, localizado no pedúnculo óptico, e no órgão-Y, localizado no cefalotórax. O hepatopâncreas por ser o principal órgão metabólico e apresentar alterações ao longo do ciclo de muda apresenta-se como um alvo importante do ciclo de muda. Diante da importância do ciclo de muda de crustáceos e sua possível modulação em resposta a temperatura, objetivamos investigar mecanismos regulatórios nos estágios de intermuda e pré-muda do *Callinectes sapidus* (siri azul) frente a estímulos térmicos abaixo e acima da condição controle. Neste contexto, a morfologia do hepatopâncreas, a concentração de ecdisteroides, colesterol e triglicérides circulantes na hemolinfa, a expressão de genes-chave e a proteogenômica da espécie foram analisadas. Mudanças mais acentuadas sobre o hepatopâncreas foram vistas nos espécimes em pré-muda entre as temperaturas, embora na intermuda também ocorram, mas de maneira mais sutil. Os níveis de ecdisteroides foram consideravelmente reduzidos quando os animais em pré-muda foram submetidos ao frio. Dentre os metabólitos o colesterol apresentou diferença entre os estágios e na pré-muda sua concentração foi afetada pela temperatura, já nos triglicérides a condição térmica mais alta distinguiu significativamente entre os estágios. A expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) foram alteradas principalmente no hepatopâncreas e se mostraram dependentes da temperatura e do estágio de muda. A alta expressão das HSPs no órgão-Y ocorreram quando os animais de pré-muda foram submetidos ao frio. Os receptores de ecdisteroides no pedúnculo óptico estavam mais expressos na intermuda comparando-se com a pré-muda e a temperatura parece não acometer essa resposta, ao contrário de sua expressão no hepatopâncreas que foi significativamente maior quando os animais de pré-muda foram estimulados pelo frio. A síntese do hormônio inibidor da muda (MIH) parece ser constitutiva, já que os diferentes estágios e as temperaturas não causaram mudanças; no entanto, seu receptor no órgão-Y sofreu redução na expressão gênica em animais em pré-muda submetidos ao frio, sendo menor também em comparação aos espécimes de intermuda na mesma condição. O hormônio hiperglicemiante de crustáceos (CHH) apresentou um aumento na sua

expressão quando os animais de intermuda foram submetidos a temperatura acima da condição controle, tanto entre as outras temperaturas no mesmo estágio, quanto a mesma temperatura no outro estágio, a pré-muda. A proteogenômica nos possibilitou correlacionar os dados até então obtidos com o conteúdo proteico do pedúnculo óptico, o que revelou diferenças na abundância de proteínas majoritárias entre os estágios avaliados, sendo a homeostase energética celular e o processo de alteração estrutural da cutícula associados a pré-muda e intermuda, respectivamente. Um fenótipo de intermuda em animais de pré-muda submetidos ao frio foi constatado tanto nos níveis circulantes de ecdisteroides quanto na análise de agrupamento entre os estágios de muda sob as 3 temperaturas. Quanto às proteínas de choque térmico, estas apresentaram-se reduzidas nos animais de pré-muda submetidos ao frio. Em definitivo, os hormônios peptídicos MIH e CHH estavam reduzidos na intermuda em comparação a pré-muda sugerindo uma liberação destes pela glândula do seio. Nossos resultados demonstraram que a temperatura é um modulador efetivo das respostas relacionadas ao ciclo de muda em vários níveis, e que a temperatura abaixo da condição controle causou um maior efeito sobre as respostas avaliadas em relação a condição controle, principalmente quando o animal se encontra no estágio de pré-muda.

Palavras-chave: Siri-azul, Temperatura, Órgãos Neuroendócrinos, Hormônios, Proteínas.

ABSTRACT

Environmental cues can generate changes in physiological processes of crustaceans, such as the molting cycle. The molting process is a cyclic event subdivided into 5 main stages and each of them presents distinct characteristics that lead to specific physiological responses during this cycle. This process is mainly regulated by hormones produced in the neuroendocrine complex, the X-organ / sinus gland, located in the eyestalk, and the Y-organ, located in the cephalothorax. The hepatopancreas, being the main metabolic organ and presenting changes throughout the molting cycle, presents itself as an important target of the molting cycle. Given the importance of the crustacean molting cycle and its possible modulation in response to temperature, we aimed to investigate regulatory mechanisms in the intermolt and pre-molt stages of *Callinectes sapidus* (blue crab) facing thermal stimuli below and above the thermo-neutral condition. In this context, the morphology of the hepatopancreas, the concentration of ecdysteroids, cholesterol and circulating triglycerides in the hemolymph, the expression of key genes, and the proteogenomics of the species were analyzed. More pronounced changes in the hepatopancreas were seen in premolt specimens between temperatures, although they also occur in intermolt, but more subtly. Ecdysteroid levels were considerably reduced when premolt animals were subjected to cold. Among metabolites, cholesterol showed a difference between stages and its concentration was affected by temperature in premolt animals, while triglycerides were distinguished between stage at the the highest thermal condition. The expression of heat shock proteins (HSPs) was mainly altered in the hepatopancreas and showed to be dependent on temperature and molt stage. High expression of HSPs in the Y-organ occurred when premolt animals were subjected to cold. Ecdysteroid receptors in the eyestalk were more expressed in intermolt compared to premolt and temperature does not seem to affect this response. Unlikely its expression in the hepatopancreas was significantly higher when premolt animals were stimulated by cold. The synthesis of molt inhibiting hormone (MIH) appears to be constitutive, since different stages and temperatures did not cause changes; however, its receptor in the Y-organ underwent a reduction in gene expression in pre-molt animals subjected to cold, being also lower compared to intermolt specimens under the same condition. The crustacean hyperglycemic hormone (CHH) showed an increase in its expression when intermolt animals were subjected to a temperature above control condition, either between temperatures at the same stage or at the same temperature in another stage, premolt.

Proteogenomics allowed us to correlate data obtained so far with protein content of eyestalk which revealed differences in the abundance of major proteins between the evaluated stages: cellular energy homeostasis and cuticle structural alteration processes associated with premolt and intermolt respectively. An intermolt phenotype was observed in both the circulating ecdysteroid levels and the cluster analysis between molt stages under 3 temperatures. As for heat shock proteins, they were reduced in pre-molt animals subjected to cold. Definitively, the peptide hormones MIH and CHH proved to be reduced during intermolt compared to premolt stages suggesting increased release by the sinus gland. Our results demonstrated that temperature is an effective modulator of responses related to the molting cycle at various levels, and that temperature below the control condition caused a greater effect on the evaluated responses in relation to the thermo-stable condition, especially when the animal is in the pre-molt stage.

Keywords: Blue crab, Temperature, Neuroendocrine Organs, Hormones, Proteins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Ciclo de muda: o crescimento descontínuo de crustáceos	14
1.2. Regulação neuroendócrina do ciclo de muda	16
1.3. Temperatura	24
1.4. Proteogenômica: uma abordagem para aprimorar o conhecimento molecular de organismos não-modelos	27
1.5. <i>Callinectes sapidus</i>: o modelo	32
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. METODOLOGIA	35
4.1. Animais e manutenção	35
4.2. Delineamento experimental	36
4.3. Eutanásia e obtenção das amostras	37
4.4. Imunoensaio para ecdisteroides	38
4.5. Dosagem de metabólitos	40
4.6. Histologia do hepatopâncreas	40
4.7. Expressão gênica	40
4.7.1. Extração e purificação do RNA	41
4.7.2. Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR)	41
4.7.3. PCR quantitativo (qPCR)	42
4.8. Análises estatísticas	43
4.9. Proteômica (feita em colaboração com Dr. José Thalles Lacerda)	44
4.9.1. Extração proteica e digestão triptica com o método de preparação assistido por filtro (Filter-Aided Sample Preparation, FASP)	44
4.9.2. Análise por nano-cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas - ionização por eletrospray - em modo sequencial (nanoLC-ESI-MS/MS)	46
4.9.3. Construção de banco de dados personalizado de sequências proteicas de <i>C. sapidus</i>	48
4.9.4. Pesquisa de banco de dados, quantificação livre de marcadores (Label-free quantification, LFQ) e análise por bioinformática	50

5. RESULTADOS	54
5.1. Histologia do hepatopâncreas	54
5.2. Níveis circulantes de ecdisteroides e metabólitos	57
5.3. Expressão gênica	59
5.3.1. <i>Proteínas de choque térmico</i>	59
5.3.2. <i>Receptor de ecdisteroides</i>	62
5.3.3. <i>Genes relacionados à inibição da muda</i>	63
5.4. Proteogenômica	64
5.4.1. <i>Caracterização do proteoma do pedúnculo óptico de C. sapidus</i>	64
5.4.2. <i>Diferenciação dos proteomas do pedúnculo óptico entre animais nos estágios de pré-muda e intermuda sob condições termoestáveis (24°C)</i>	69
5.4.3. <i>Modulação dos proteomas do pedúnculo óptico em estágios de pré-muda e intermuda em resposta aos estresses térmicos (19°C e 29°C)</i>	75
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÃO	96
8. REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ciclo de muda: o crescimento descontínuo de crustáceos

Os artrópodes, incluindo os crustáceos, apresentam um modo particular de crescimento, comparado a outros grupos animais. Isso porque estes animais compartilham um esqueleto externo, conhecido como exoesqueleto (Hartnoll, 1978), formado por 3 camadas de cutícula. A camada que serve de barreira para o ambiente externo é denominada epicutícula, composta predominantemente por lipoproteínas, não possui mineralização e é impermeável; a exocutícula e endocutícula (camada mais interna) são ambas formadas por fibras de quitina, e apresentam-se em forma de lamelas que, combinadas com mineralização por cálcio, contribuem para a rigidez e resistência mecânica da cutícula (Nagawasa, 2012; Mrak et al, 2017). Além das 3 camadas de cutícula, o exoesqueleto é constituído também por uma camada membranosa, localizada abaixo da endocutícula, e que tem contato direto com a epiderme e não apresenta mineralização (Roer et al., 2015).

De maneira geral, o exoesqueleto é renovado a cada ciclo de crescimento. A perda da cutícula atual é consequência da separação da camada membranosa das outras 3 camadas que formam a cutícula, o que promove uma alteração de cor no pereópodo do apêndice natatório (5º par de pereópodos). Essa mudança de coloração é uma importante informação sobre o tempo em que a apólise do exoesqueleto irá acontecer. O momento da apólise do exoesqueleto é conhecido como ecdise, um dos 5 estágios principais do ciclo de muda. Este processo combina fatores fisiológicos e comportamentais, e pode ser regulado ainda por fatores externos, como fotoperíodo, temperatura, salinidade, entre outros.

O ciclo de muda é dividido em 5 principais estágios, que são: 1) pré-muda, o período em que o animal começa a se soltar do exoesqueleto atual, ocorrendo neste

período a reabsorção de minerais e nutrientes da cutícula antiga, principalmente cálcio;

2) ecdise, fase mais curta do ciclo, onde ocorre a apólise (separação da cutícula do antigo exoesqueleto com a epiderme);

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 (peças bucais) torna-se rígida. Durante este processo, o animal pode experimentar um período de vulnerabilidade, já que o novo exoesqueleto ainda está se endurecendo e solidificando;

e 5) intermuda, o exoesqueleto fica completamente rígido e o animal cessa o crescimento.

Deve-se salientar que os estágios de intermuda e pré-muda são subdivididos ainda em sub-estágios, e assim como eles, as características morfológicas do ciclo de muda estão descritas na Figura 1.

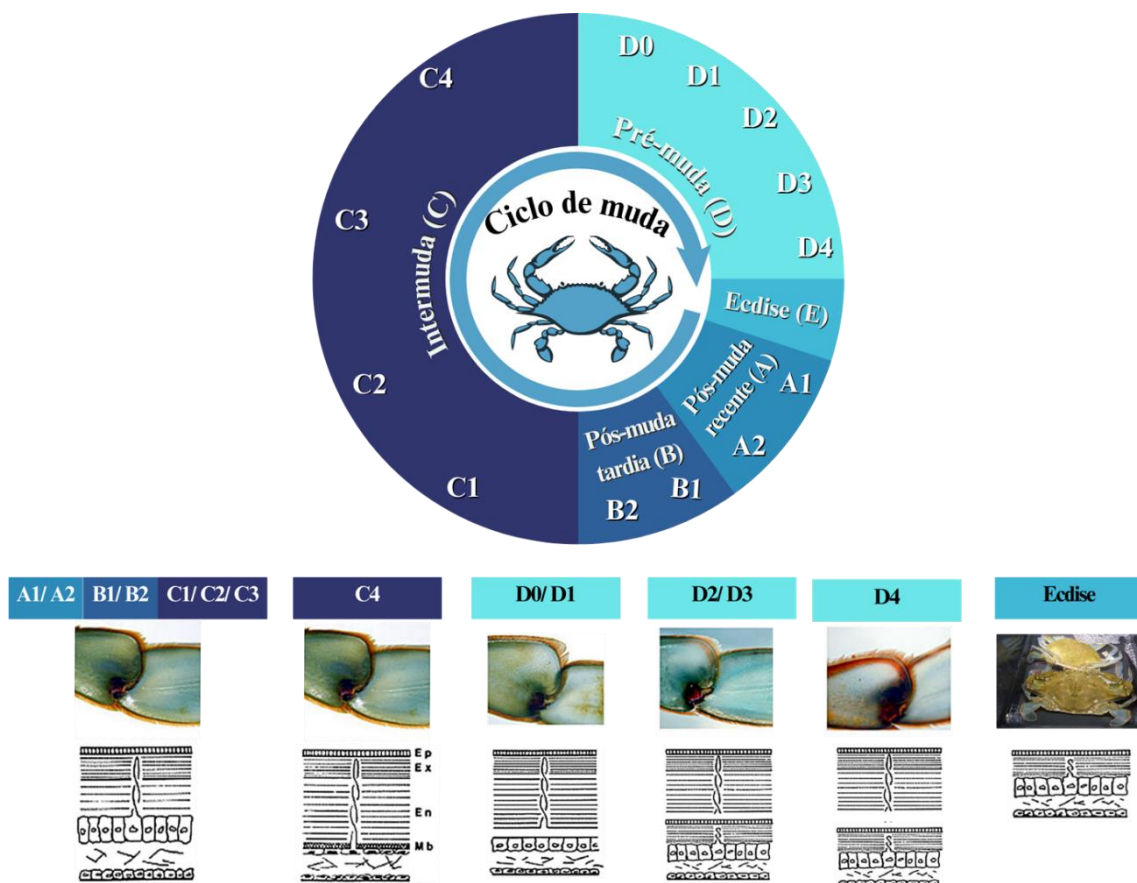


Figura 1. Esquema resumido do ciclo de muda em *C. sapidus* incluindo os estágios de muda e seus respectivos sub-estágios, alterações morfológicas indicativas da aproximação da ecdise e a estrutura da cutícula entre os estágios.

A frequência, incremento e período do ciclo de muda são variáveis dependentes, de maneira geral, da idade e do sexo do animal, além de fatores externos e ambientais. O número de ecdises ocorridas em um determinado período de tempo é chamado de frequência de muda; o incremento de muda é relativo ao ganho de peso/tamanho do animal entre duas ecdises; e o período de muda diz respeito ao tempo decorrido entre uma ecdise e outra. Na espécie *Halicarcinus planatus*, a frequência de muda é sazonal e similar entre machos e fêmeas, já o incremento é variável entre os sexos (Diez e Lovrich, 2013). Em contrapartida, em outra espécie de crustáceo, o caranguejo *Cancer borealis*, a frequência de mudas é reduzida em machos com carapaça maiores que 120 mm (Truesdale et al., 2019).

Fêmeas maduras que completaram o seu ciclo reprodutivo entram em estágio de aneclipse (ausência de mudas) (Diez e Lovrich, 2013), consequente da degeneração do órgão-Y (YO), produtor do hormônio indutor da muda, os ecdisteroides, e do aumento na produção do hormônio inibidor da muda (Jivoff et al., 2007). Mesmo com esses fatores, a presença de um estímulo externo pode acarretar uma ecdise pós-maturação. A retirada do pedúnculo ocular de fêmeas maduras de *C. sapidus* promoveu a troca de carapaça, assim como também a regeneração de membros de espécimes observadas em campo, processo consequente da ecdise. Estes dados sugerem que fêmeas de *C. sapidus* podem sofrer ecdise adicional após a maturidade (Havens e McConaughy, 1990). De maneira geral, a espécie *C. sapidus* realiza 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).

1.2. Regulação neuroendócrina do ciclo de muda

Por ser um processo cíclico com fase de indução e inibição da ecdise, pressupõe-se que haja uma regulação hormonal positiva e negativa sobre o ciclo de muda. Nesse

caso, hormônios esteroidais são os responsáveis majoritários pela ecdise em crustáceos. A estrutura responsável pela síntese e liberação do hormônio indutor da muda é um par de glândulas localizadas no cefalotórax, denominadas de órgão-Y, cujas células apresentam numerosas mitocôndrias e um extenso retículo endoplasmático, características de um tecido esteroidogênico (Skinner, 1985; Lachaise et al., 1993; Mykles, 2011).

A síntese dos ecdisteróides inicia-se pela obtenção do colesterol através da dieta, uma vez que crustáceos não sintetizam colesterol *de novo*. Esta molécula liga-se a lipoproteínas de alta densidade para ser absorvida pelo órgão-Y e assim proceder à síntese. A via biossintética dos ecdisteróides em crustáceos pode ser dividida em 2 estágios: o primeiro diz respeito à conversão do colesterol em 5 β -dietetol e o segundo a conversão de 5 β -dietetol em diversos precursores de ecdisteróides, dos quais a ecdisona (E) e a 3-deidroecdisona (3DE) são os produtos mais secretados pelo órgão-Y nos crustáceos decápodes (Mykles, 2011). Disponíveis na hemolinfa, os ecdisteróides atravessam a membrana celular dos tecidos periféricos e lá são convertidos em ecdisteróides ativos pelas enzimas 3 β -redutase, 25-hidroxilase e 20-hidroxilase, a depender do órgão (Spazziani et al., 1999; Mykles, 2011). A concentração e os tipos de ecdisteróides disponíveis na hemolinfa podem variar entre espécies (Mykles, 2011), sexo (Cuzin-Roudy et al., 1989; Tamone et al., 2005), estágios de vida (Wilder et al., 1990; Chung, 2010), e evidentemente estágios e sub-estágios do ciclo de muda (Snyder e Chang, 1991; Martin-Creuzburg et al., 2007).

O órgão-Y transita por 4 estados fisiológicos ao longo do ciclo de muda. Na intermuda, a glândula responsável pela síntese e secreção de ecdisteróides encontra-se no estado basal, com baixa secreção dos hormônios da muda. A seguir, o órgão-Y entra no estado ativado, no início da pré-muda, com a hipertrofia e um aumento na capacidade

sintética do órgão. Uma vez ativado, o órgão-Y compromete-se com a ecdise, apresentando o estado comprometido no meio para o final da pré-muda. E o ciclo encerra-se no final da pré-muda com o órgão-Y no estado reprimido, com a redução na capacidade de sintetizar os ecdisteroides (Mykles e Chang, 2020).

Os estágios fisiológicos do órgão-Y estão intimamente relacionados com o hormônio inibidor da muda, o MIH. Este e outros hormônios são sintetizados em um sítio que contém diversos corpos celulares de neurônios, cujos axônios se conectam a uma glândula seguindo um modelo clássico de um complexo neuroendócrino que nos crustáceos é conhecido como órgão-X/glândula do seio (XO/SG). Localizado nos pedúnculos ópticos dos animais, o XO/SG é responsável por sintetizar, além do MIH, outros hormônios peptídicos relacionados a processos fisiológicos tais como, migração de pigmentos cromatóforicos e retiniais, metabolismo de carboidratos, reprodução, muda e crescimento, equilíbrio osmótico e iônico e atividade cardíaca (Kleinholz, 1976).

Dentre os hormônios sintetizados no XO/SG estão os hormônios de dispersão e concentração de pigmentos, PDH e PCH (Nery e Castrucci, 1997; 2002), respectivamente, e a superfamília dos hormônios hiperglicemiantes de crustáceos (CHH). Essa superfamília apresenta sequências peptídicas relacionadas, mas funcionalidades diversas, e é subdivida em dois grupos. O primeiro grupo, ou CHH tipo 1, é representado pelo hormônio hiperglicemiante de crustáceos propriamente dito, o CHH, que tem como principais funções regular o metabolismo de carboidratos (Santos e Keller, 1993) e a hiperglicemia induzida pelo estresse (Webster, 1996; Chang et al., 1998; Lorenzon et al., 2004), além de, em algumas espécies, regular negativamente a síntese de ecdisteroides (Webster e Keller, 1986; Chung e Webster, 2003).

O segundo grupo, ou CHH tipo II, inclui o hormônio inibidor gonadal (GIH) ou hormônio inibidor da vitelogênese (VIH), que atua sobre a vitelogênese durante a

maturação gonadal em crustáceos, inibindo a produção de vitelogenina ovariana e hepatopancreática (Chen et al., 2014, Kornthong et al., 2019). Inclui também o hormônio inibidor do órgão mandibular (MOIH), que atua inibindo o órgão mandibular e a síntese do metil farnesoato (MF) (Wainwright et al., 1996), hormônio análogo ao hormônio juvenil III (JH III) dos insetos (Nagaraju, 2007; 2011), e sobre o órgão-Y aumentando a síntese de ecdisteroides (Tamone e Chang, 1993; Reddy et al., 2004; Nagaraju et al., 2006; Nagaraju, 2011), validando assim, seu papel positivo sobre o ciclo de muda.

O MIH é o outro representante do grupo CHH tipo II e o principal inibidor do ciclo de muda. A retirada do pedúnculo óptico e o consequente aumento dos ecdisteroides corrobora o fato de que a inibição do ciclo de muda é proveniente do complexo XO/SG; esta técnica é utilizada até os dias de hoje para eliminar a influência dos hormônios sintetizados pelo XO/SG sobre as respostas avaliadas (Bittner e Kopanda, 1973; Aktas et al., 2003; Hensi et al., 2008). Ademais, estudos *in vitro* como a incubação do órgão-Y com MIH (Nakatsuji e Sonobe, 2004) e *in vivo* com injeção de recombinantes do hormônio em animais que tiveram o pedúnculo óptico excisado (Pamuru et al., 2012) confirmaram que a síntese de ecdisteróides é inibida pelo MIH.

Por atuarem de forma antagônica no crescimento dos crustáceos, os níveis de ecdisteroides e MIH flutuam em anti-fase ao longo do ciclo de muda (Quackenbush, 1986; Chang, 1995; Philippen et al., 2000), evento também relacionado com os estágios fisiológicos do órgão-Y evidenciados nos estudos atuais sobre a regulação hormonal do ciclo de muda (Das et al., 2018; Mykles e Chang 2020; Mykles, 2021). Durante a intermuda, uma liberação pulsátil de MIH mantém o YO no estado basal, que passa para o estado ativado quando uma redução na secreção de MIH ocorre no início da pré-muda; do meio para o final da pré-muda há um aumento na capacidade sintética do YO e uma redução da sensibilidade ao MIH apresentando-se no estado comprometido. Ao final da

pré-muda, o YO entra no estado reprimido onde a atividade ecdisteroidogênica é reduzida e os níveis de MIH aumentados; este estado se mantém durante a pós-muda e retorna ao estado basal na intermuda (Mykles e Chang 2020). A ativação do YO é dependente do *mechanistic target of rapamycin* (mTOR), enquanto o *activin/transforming growth factor-beta* (TGF β) tem seu papel relacionado ao estado comprometido do YO (Das et al., 2018; Mykles, 2021).

Este aumento da secreção de MIH no fim da pré-muda observado em algumas espécies (Nakatsuji e Sonobe, 2004) vem sendo estudado como um *feedback* positivo dos ecdisteroides sobre a expressão de MIH e negativo sobre sua própria síntese e o ciclo de muda (Techa e Chung 2015; David et al., 2022). O receptor de ecdisteroides (EcR) é um heterodímero de EcR e RXR (receptor do ácido retinóico em crustáceos), sendo 4 isoformas (*CasEcR1*, *CasEcR1a*, *CasEcR2* e *CasEcR2a*) descritas para *C. sapidus* (Techa e Chung, 2013). A ativação desse receptor por ecdisteroides estimula ou inibe a transcrição do gene-alvo (Hill et al., 2013). Techa e Chung (2015) sugeriram que, em *C. sapidus*, após os ecdisteroides atingirem certos níveis na hemolinfa estimulam a síntese de MIH para encerrar o ciclo de muda com a ecdise.

A sinalização do MIH sobre o órgão-Y por sua vez vem sendo amplamente discutida. Revisões recentes compilaram dados de diversos crustáceos e sugeriram as etapas da sinalização do MIH. De maneira geral, o MIH liga-se a um receptor de membrana que ativa uma adenilil ciclase, elevando então os níveis de AMPc e a consequente ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA exerce duas ações: 1- fosforilação e abertura de canais de membrana que permite a entrada de cálcio para o meio intracelular. O aumento do Ca²⁺ ativa a calmodulina que por sua vez ativa uma óxido nítrico sintase, elevando os níveis de óxido nítrico intracelulares. Uma guanilil ciclase intracelular então é ativada clivando GTP em GMPc que é responsável por ativar a

proteína quinase G (PKG) e então inibir a síntese dos ecdisteroides; e 2- inibição direta em nível transcricional/traducional da síntese dos ecdisteroides (Das et al., 2018; Mykles e Chang, 2020; Mykles, 2021).

No entanto há controvérsias no que diz respeito a ação do MIH sobre o órgão-Y em *Callinectes sapidus*. Um receptor do tipo guanilil ciclase de membrana (rGC) foi caracterizado como sendo o receptor de MIH em *C. sapidus* (*CasCGY01*), devido ao aumento de GMPc em resposta ao MIH, além da alta expressão do gene que codifica o rGC no estágio da intermuda, o mesmo no qual o MIH está elevado (Zeng et al, 2008). Além disso, os níveis intracelulares de Ca^{2+} no órgão-Y são diretamente proporcionais ao aumento nos níveis de ecdisteróides hemolinfáticos induzidos pela excisão do pedúnculo óptico (Chen e Watson, 2011). Outro estudo que evidenciou a relação do cálcio intracelular com a ecdisteroidogênese mostrou que os níveis desse íon se encontravam mais elevados nos sub-estágios iniciais da pré-muda, momento no qual a síntese de ecdisteróides começa a aumentar, e reduzidos na intermuda, onde a ecdisteroidogênese é inibida (Chen et al, 2012). Considerando a literatura para *C. sapidus*, avaliamos nesse estudo o receptor guanilil ciclase de membrana (*CasCGY01*) como via de inibição do MIH no órgão-Y. A flutuação dos hormônios ao longo do ciclo de muda está resumida na Figura 2.

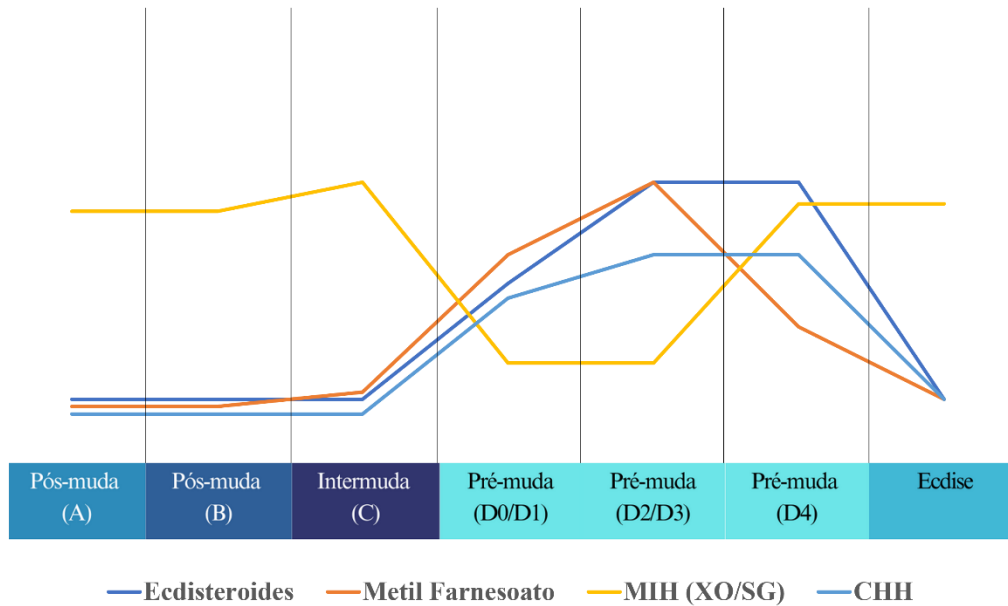


Figura 2. Gráfico representativo da flutuação nas concentrações dos hormônios ecdisteroides (hemolinfa), metil farnesoato (hemolinfa), MIH (síntese e estoque), e CHH (síntese) ao longo do ciclo de muda. XO/SG=órgão-X/glândula do seio. Modificado de Chang e Mykles, 2012.

Um fator importante para um crescimento rápido e endurecimento do exoesqueleto bem-sucedidos nos crustáceos envolve a alimentação. Já foram relatadas variações na expressão de genes relacionados ao ciclo de muda em resposta a diferentes nutrientes e aditivos alimentares (Alhoshy et al., 2022). Os principais processos digestivos nos crustáceos são mediados por proteases e lipases que, quando aumentadas, são associadas a uma melhora no crescimento dos indivíduos (Hu e Leung, 2007; Proespraiwong et al., 2010; Xue et al., 2013). O hepatopâncreas é o principal órgão do trato digestivo dos decápodes e o principal responsável pelo metabolismo. Localizado no cefalotórax, consiste em dois sistemas tubulares bilateralmente simétricos, onde cada túbulo é revestido por um epitélio único e cercado por seios hemolinfáticos. Os túbulos são constituídos de 5 tipos celulares, que são células embrionárias (E), reabsortivas (R), fibrilares (F), *blister-like* (B) e *midget* (M) (Röszer, 2014; Vogt, 2019). Nenhuma diferença foi encontrada na ultraestrutura do hepatopâncreas do caranguejo-aranha *Maja*

brachydactyla entre estágios de vida, apenas uma diferença no tamanho das células que foi maior nos adultos (Castejón et al., 2019).

As células E são responsáveis pela regeneração do hepatopâncreas, sendo progenitoras celulares, com uma característica típica de células embrionárias, e uma alta razão citoplasma/núcleo. A absorção de nutrientes, por sua vez, é mediada pelas células R, o tipo celular mais abundante no hepatopâncreas, capazes de armazenar reservas de energia como lipídeos e glicogênio que são catabolizadas durante a muda (Al-Mohanna e Nott, 1989), na privação de alimento (Vogt et al., 1985; Cervellione et al., 2017) e na vitelogênese (Vogt et al., 1989). O Ca^{2+} também é reservado no hepatopâncreas como CaPO_4 durante a pré-muda (Becker et al., 1974) e, após a ecdise, é mobilizado para calcificar a nova cutícula (Zanotto e Weatly, 2002). As enzimas digestivas, carboidrases, lipases e proteinases, são sintetizadas no hepatopâncreas pelas células F e descarregadas no lúmen tubular para serem acumuladas no estômago cardíaco, ou seja, as células F não armazenam as enzimas, apenas as sintetizam. Ainda existem lacunas na literatura sobre a função das células B, isso porque alguns autores consideram-nas como células F maduras que possuem um vacúolo central para o armazenamento de enzimas digestivas (Hu e Leung, 2007; Watling, 2013). As características estruturais destas células sugerem síntese de proteínas e absorção de materiais do lúmen tubular, materiais esses que eram desconhecidos até então (Vogt, 2019). De acordo com a estrutura das células B e do que se sabe até então, quatro possibilidades do seu papel na digestão foram levantadas: 1- absorção de nutrientes como o colesterol, já que os nutrientes de baixo peso molecular, são comprovadamente absorvidos pelas células R (Vogt, 2019); 2- limpeza dos túbulos hepatopancreáticos; 3- síntese de peroxidase e muco; e 4- síntese e reciclagem de emulsificantes lipídicos (Vogt, 2021).

Considerando o contexto acima, a literatura evidencia a relação do metabolismo e alterações hepatopancreáticas com o ciclo de muda (Gimenez et al., 2001; Gimenez et al., 2002; Liu et al., 2021). O hepatopâncreas também possui uma relação estreita com a reprodução, uma vez que produz e secreta vitelogenina, molécula precursora do vitelo (Jayasankar et al., 2002; 2020), mas esta função varia entre as espécies (Subramoniam, 2011). Estudos relataram também que o MIH estimula a produção de vitelogenina pelo hepatopâncreas (Zmora et al., 2009a, Zmora et al., 2009b; Luo et al., 2015).

1.3. Temperatura

As alterações climáticas resultam em um aumento na frequência e na gravidade das ondas de temperaturas extremas. Os processos comportamentais, incluindo a migração, e fisiológicos dos animais, de maneira geral, são influenciados por mudanças na temperatura ambiental, e estima-se que, no futuro, a elevação deste parâmetro venha a ser deletéria para os organismos (Stillman, 2019). É válido considerar que a temperatura da água influencia a solubilidade dos gases e poluentes, toxicidade de produtos químicos, pH, além de controlar ciclos de nutrientes e a degradação de matéria orgânica (Bonacina et al., 2023). Nos vertebrados, consideram-se 3 categorias de resposta ao estressor ambiental: a primária, com liberação de corticosteroides, catecolaminas e respostas neuroendócrinas; a secundária que inclui alterações imunológicas, osmorregulatórias, metabólicas; e a terciária que altera o comportamento e as respostas fisiológicas do estresse em todo o organismo (Ren et al., 2021). Essas informações servem de caminho para investigar os efeitos da temperatura em organismos não-vertebrados.

Uma gama de estudos vem demonstrando a influência da temperatura sobre parâmetros comportamentais e fisiológicos de crustáceos. Temperaturas mais altas levam o caranguejo estuarino semi-terrestre *Neohelice granulata* a utilizar o comportamento de

emersão para que possa sobreviver (Halal et al., 2020); assim como alteram biomarcadores no hepatopâncreas, músculo e brânquias do anomuro *Aegla longirostri* (Cerezer et al., 2020). No camarão *Palaemon gravieri*, um estresse agudo de aumento térmico causou diminuição na capacidade metabólica, mas em contrapartida, aumentou a capacidade imunológica, provável estratégia para resistir ao estresse (Shi et al., 2022). Além disso, a defesa contra bactérias em *Pacifastacus leniusculus* (Korkut et al., 2018), o desempenho cardíaco de *Homarus americanus* (Worden et al., 2006; Camacho et al., 2006), a atividade locomotora de *Uca pugilator* (Mat et al., 2017), entre outros padrões comportamentais e fisiológicos, são dependentes da temperatura.

A frequência, período e incremento do ciclo de muda também são afetados diretamente pela temperatura. O período e o incremento de muda mostraram uma relação inversamente proporcional com o aumento da temperatura em *Paralithodes platypus* (Stoner et al., 2013) e juvenis de *C. sapidus* (Leffler, 1972; Cunningham e Darnell, 2015). Altas temperaturas combinadas com a retirada do pedúnculo óptico (Hensi et al., 2008), bem como altas temperaturas combinadas com luz contínua (24:0 LD) (Pervaiz et al., 2015) promoveram um aumento na frequência do ciclo de muda.

Moléculas-chave envolvidas no ciclo de muda são alvos das mudanças de temperatura. Os genes relativos a um grupo de enzimas responsáveis pela síntese de ecdisteroides em *Paralithodes camtschaticus* tendem a ser regulados positivamente por temperatura alta (Andersen et al., 2022). Os níveis de RNAm dos receptores de ecdisteroides em juvenis de *Scylla paramamosain* aumentaram de acordo com o aumento de temperatura (Gong et al., 2015). Espécimes do caranguejo *Cancer borealis* submetidos a altas temperaturas apresentaram diminuição da concentração de neuropeptídeos liberados pelo órgão pericárdico, e de vários peptídeos de orcocinina pelo XO/SG (Chen

et al., 2014). A sinalização mTOR e o nível dos neuropeptídeos CHH e MIH também são reduzidos com o aumento da temperatura (Wittman et al., 2018).

Em posse do conhecimento sobre os limites térmicos de cada espécie, a temperatura pode ser considerada em alguns casos um agente estressor. Um grupo de proteínas que responde às alterações de temperatura são as proteínas de choque térmico (HSPs) e proteínas de choque térmico constitutivas (HSCs), denominadas assim devido à sua descoberta em *loci* do cromossomo da mosca da fruta responsivos a temperatura (Ritossa, 1962). Atualmente se sabe que essas proteínas podem ser ativadas por uma gama de agentes estressores além da temperatura.

As HSCs e HSPs atuam na regulação de genes específicos cuja transcrição é mediada pela interação de fatores de choque térmico com elementos de choque térmico em regiões promotoras de genes (Roberts et al., 2010). As famílias HSP90 e HSP70 são importantes protetores celulares, auxiliando no dobramento de outras proteínas recém-formadas nos ribossomos, bem como na proteção de proteínas da ligação a moléculas hidrofóbicas. Além disso, podem atuar na formação ou quebra de complexos proteicos e na degradação de proteínas mal dobradas (Beckman et al., 1990; Roberts et al., 2010). Dados sugerem que a família das HSPs possui ainda uma diferenciação funcional em resposta a condições estressantes de temperatura (Martín-Folgar et al., 2015). São altamente conservadas e seu papel em diversos organismos já foi investigado (Scudiero et al., 2019; Gbotsyo et al., 2020; Bultelle et al., 2021).

Em crustáceos, as proteínas de choque térmico vêm sendo estudadas sob diversos aspectos. Aumento de temperatura, acima da temperatura ótima de *Macrobachium malcomsonii*, reduz os níveis de HSP70, atribuído a uma parada na síntese de proteínas devido às altas temperaturas (Selvakumar e Geraldine, 2005). *Litopenaeus vannamei*, aclimatados a 25°C foram submetidos a um choque de frio (13°C) o que culminou em um

aumento da HSP70 contribuindo na melhora da tolerância de camarões expostos ao ar (Guan et al., 2021).

Variações intraespecíficas na expressão da HSP70 foram identificadas no caranguejo *Pachygrapsus marmoratus* (Madeira et al., 2012). Durante o início da organogênese de *Exopalaemon carinicauda*, a HSP90 é um importante fator regulador da transcrição da vitelogenina (Liang et al., 2020). Em *Homarus americanus*, estresses osmótico e térmico levaram a alterações na expressão gênica das proteínas HSP70 e HSP90 (Chang, 2005). As HSPs têm sido relacionadas também à atrofia do músculo da garra e ao ciclo de muda na espécie *Homarus americanus* (Spees et al., 2003) e no camarão *Litopenaeus vannamei* (César e Yang, 2007).

Para *Callinectes sapidus*, García-Rueda e colaboradores (2021) demonstraram que a temperatura crítica (CT) da espécie é 42°C (máxima) e 11°C (mínima) e que a sua preferência térmica está entre 26 e 33°C no golfo do México, no entanto, considerando a distribuição global a janela térmica ótima é de 22°C-23°C (Marchessaux et al., 2022).

Estudos sobre efeitos de variações de temperatura nesta espécie concentram-se em grande parte nas infecções por parasitas e seus efeitos no siri-azul, como por exemplo, um aumento na mortalidade de siris infectados pelo parasita dinoflagelado *Hematodinium perezii* em temperaturas mais altas (25 e 30°C) (Huchin-Mian et al., 2018), e alterações órgão-dependente da imunidade inata contra o *reo-like* vírus frente a um aumento de 13°C na temperatura (Chung et al., 2015). No entanto variações neuroendócrinas relacionadas ao crescimento dessa espécie submetida a alterações térmicas ainda são pouco exploradas.

1.4. Proteogenômica: uma abordagem para aprimorar o conhecimento molecular de organismos não-modelos

Organismos não-modelo, isto é, aqueles pouco estudados em condições controladas de laboratório ou, simplesmente, pouco caracterizados em nível de biologia molecular e que exigem um protocolo de adaptação e desenvolvimento de métodos (Armengaud et al., 2014), como o *Callinectes sapidus*, ainda são desafios da ciência contemporânea devido a informações limitadas. Embora recentes avanços proporcionados pelas tecnologias ômicas tenham produzido um grande volume de dados através dos sequenciamentos de DNA e RNA que podem ser usados para caracterizar uma proteína indiretamente, ainda é intrigante a transferência de informação da anotação gênica até a biologia funcional e, nem sempre, de caráter linear.

As abordagens em nível de DNA e RNAm, embora necessárias e importantes, não capturam todo o espectro de genes codificadores de proteínas dadas algumas limitações dos algoritmos usados nas montagens das sequências e a complexidade do genoma. A heterogeneidade na tradução de RNAm, modificações pós-traducionais (PTMs) e processamento estrutural pós-traducional são revelados apenas pela análise direta em nível de proteínas que, por sua vez, orquestram os aspectos funcionais da biologia (Espinosa et al., 2021).

A partir do aprimoramento de tecnologias de alto rendimento e novos *pipelines* relacionados a análise proteômica baseada em espectrometria de massas (*mass spectrometry*, MS), uma análise que permite a caracterização em larga escala de todo o complemento proteico de uma linha celular, tecido ou organismo, usada em diversas aplicações biológicas (Graves e Haystead, 2002), tornou-se possível reduzir as lacunas experimentais que confirmam a expressão de proteínas a partir de modelos genéticos computacionalmente previstos para estudar os aspectos da biologia funcional com maior fidedignidade. Neste contexto, a proteogenômica, uma área de pesquisa que atua na interface da proteômica e da genômica/transcriptômica, onde bancos de dados de

sequências de proteínas gerados a partir de informações genômicas e transcriptômicas são usados na análise proteômica baseada em MS, tem fornecido evidências de expressão gênica em nível de proteína para ajudar a refinar os modelos genéticos (Nesvizhskii et al., 2014).

Em espécies para as quais não há genoma sequenciado e/ou anotado em repositórios públicos, sequências obtidas por análise do transcriptoma podem ser usadas como banco de dados para a predição de proteínas potencialmente codificadas, reforçando a complementariedade dessa técnica com a proteômica (Evans et al., 2012). Obviamente, o sucesso da anotação do proteoma, como reflexo dos aspectos fisiológicos fenotipicamente revelados, está intimamente relacionado à qualidade dos dados adquiridos e subsequentemente da montagem do transcriptoma para a construção do banco de dados de proteínas (Cogne et al., 2020). Nesta linha, o alcance da proteogenômica permite não somente a integração de dados centrados no aperfeiçoamento de sequências de proteínas anteriormente preditas, mas também explorar as relações correlacionais entre dados de RNAm e proteínas, aplicações para decifrar o efeito de mutações e PTMs em redes de sinalização e também avaliar respostas fisiológicas em estudos comparativos (Ruggles et al., 2017).

Nesse contexto, a proteogenômica promove a caracterização molecular aprofundada dos organismos não-modelos, acelerando estudos em diversas áreas (Heck e Neely, 2020), bem como corrige anotações imprecisas do genoma e expande a diversidade do proteoma de espécies importantes comercial e ecologicamente (Chen et al., 2020; Li et al., 2020). Em organismos aquáticos, a proteogenômica tem sido utilizada para ampliar o conhecimento sobre a grande biodiversidade molecular e caracterização fenotípica (Trapp et al., 2014; Trapp et al., 2016), na ecotoxicologia (Armengaud, 2022) e na análise

de biomarcadores específicos através de técnicas de quantificação de proteínas (Gouveia et al., 2019).

A proteogenômica tem se destacado por permitir análises mais profundas de organismos não-modelos para inferir respostas fisiológicas a diversos estímulos endógenos e ambientais. Um estudo de proteogenômica realizado em larvas de *Octopus vulgaris* investigou a influência do enriquecimento alimentar no sucesso do seu cultivo através de 2.341 proteínas identificadas; no entanto, os autores destacam que a porcentagem de proteínas previstas, previstas/não caracterizadas e hipotéticas ultrapassa 75% do total revelando a alta complexidade de se trabalhar com dados massivos em organismos não-modelos (Varó et al., 2022). Nesta linha, Zhai e colegas (2021) realizaram uma análise proteogenômica usando um banco de dados personalizado com o objetivo de avaliar os mecanismos regulatórios do sistema imune do crustáceo *Scylla paramamosain* e demonstraram que 255 proteínas foram diferencialmente expressas após injeção de hormônios de vertebrados e que estavam envolvidas em vias de sinalização, imunidade celular, imunidade humoral e processos relacionados ao sistema imunológico. Uma análise proteogenômica do crustáceo *Gammarus fossarum* também foi realizada para verificar indicadores de respostas a xenobióticos (Trapp et al., 2015). Em uma comparação entre estágios de muda, das 1.527 proteínas identificadas no hepatopâncreas de *Scylla paramamosain*, 193 variaram significativamente em abundância entre os estágios de pré-muda, pós-muda e intermuda (Liu et al., 2021).

Por outro lado, quando uma base de dados de sequências proteicas de uma determinada espécie está disponível para análise de homologia, a abordagem proteômica pode ser realizada sem os mesmos obstáculos experimentais de uma proteogenômica ainda que a espécie não tenha genoma anotado. De tal modo, Liu e colegas (2022) avaliaram o efeito do óleo de maleluca sobre o metabolismo lipídico do hepatopâncreas

e a eficácia antioxidante no camarão de água-doce *Macrobrachium rosenbergii* através de 1.368 proteínas quantificadas por marcadores isotópicos (TMT-10plex).

Em alguns, quando não há anotações transcriptômicas e banco de sequências proteicas para a espécie estudada, alguns grupos de pesquisa têm realizado análise proteômica usando banco de dados generalista contendo sequências proteicas de diferentes espécies para identificar proteínas com base em homologia de domínios conservados. A análise do órgão-Y de *Gecarcinus lateralis* em diferentes estágios de intermuda e pré-muda demonstrou diferenças nos processos de esclerotização e melanização, hipertrofia glandular associada à síntese e secreção de ecdisteroides e vias metabólicas baseados em marcadores específicos diferenciados pela análise de gel bidimensional e identificados por MS (Head et al., 2019). Obviamente este tipo de abordagem oferece desafios e reduz o entendimento sobre a totalidade do proteoma e suas alterações no contexto do estudo.

Os dados da literatura através da proteogenômica/proteômica ainda são mais limitados no que diz respeito ao efeito da temperatura sobre parâmetros fisiológicos dos crustáceos. Um estudo conduzido com 2 clones de *Daphnia pulex*, sendo um deles mais resistente a temperaturas mais altas, relatou diferenças entre os estresses agudo e crônico de temperatura em ambos os clones (Becker et al., 2018). Variações dos proteomas do tecido muscular da garra do caranguejo *Petrolisthes cinctipes* foram observadas quando submetidos a choque térmico após aclimatação com flutuações diárias de temperatura. Os resultados sugeriram que o fornecimento de ATP, a reestruturação das fibras musculares e as respostas imunes foram afetados no tecido muscular após os desafios (Garland et al., 2015). A proteogenômica demonstrou que as fêmeas do anfípode *Eulimnogammarus cyaneus* possuem níveis de HSPs significativamente mais altos na condição controle de temperatura do que os machos e que nestes, o aumento dessas proteínas é observado

quando submetidos a um estresse térmico (Bedulina et al., 2020). Estes e outros estudos tornam a proteogenômica uma ferramenta valiosa para um melhor entendimento dos aspectos biológicos funcionais de organismos não-modelo.

1.5. *Callinectes sapidus*: o modelo

Callinectes sapidus (RATHBUN, 1989) é um dos milhares de representantes do sub-filo Crustacea, filo Artropoda. Da família Portunidae (Decapoda), possuem o último par de patas ambulatórias adaptadas para a natação. A espécie é nativa do Oceano Atlântico Ocidental, porém há registros de locais onde essa espécie é invasora (Mancinelli et al., 2021). São considerados estuarinos e, ao longo do ciclo de vida, experimentam todas as faixas de salinidade. Os estágios larvais iniciais e os juvenis necessitam de salinidades mais altas; espécimes machos maduros são encontrados mais comumente em áreas de média a baixa salinidade e as fêmeas maduras e ovígeras são comuns em ambientes predominantemente mais salinos (Epifanio, 2019). Os efeitos de metais pesados sobre parâmetros biológicos de *C. sapidus* vêm sendo investigados (Adams e Engel, 2014; Osayande e Zou, 2022), tornando-os possíveis bioindicadores de poluição aquática.

Os crustáceos são organismos abundantes, com alto valor econômico, ecológico e de importância nutricional (Bondad-Reantaso et al., 2012). Em 2018, cerca de 12 milhões de toneladas de crustáceos foram cultivadas e pescadas, tornando-se uma fonte de renda para as comunidades costeiras. Estima-se que 60 milhões de pessoas estejam envolvidas nos setores primários de pesca e aquicultura de crustáceos (FAO, 2020). O siri-azul é um crustáceo de importância ecológica e econômica, principalmente nos Estados Unidos. Em 2015, 73 mil toneladas dos espécimes provenientes da pesca comercial renderam 220 milhões de dólares (NMFS, 2017).

Esta espécie é também modelo para diversos estudos como ciclo de vida, regulação neuroendócrina do ciclo de muda e papel do cálcio no ciclo de muda (Freeman et al., 1987; Hines et al., 1987; Havens e McConaughy, 1990; Chung, 2010; Chen e Watson, 2011; Chen et al., 2012; Techa e Chung, 2013; Techa e Chung, 2015; David et al., 2022), entre outros.

Considerando o exposto acima, entender a fisiologia do *C. sapidus* frente a diferentes temperaturas, trará de maneira inédita resultados valiosos tanto economicamente, visando aprimorar as técnicas de cultivo da espécie, uma vez que a frequência de mudas e a temperatura afetam o tamanho dos animais, quanto fisiologicamente, possibilitando o entendimento do crescimento e o efeito dessa variável ambiental em pontos-chave do ciclo de muda. Ademais, este estudo é pioneiro na caracterização em nível molecular de 2 estágios antagônicos do ciclo de muda em temperaturas encontradas em ambiente natural, mas que ainda assim apresentam efeitos significativos para a espécie.

2. JUSTIFICATIVA

Callinectes sapidus é um crustáceo decápodo estuarino com ampla distribuição, sendo mais abundante nos estuários do sul brasileiro e considerado uma espécie invasora em alguns locais. O siri-azul é uma espécie ecologicamente importante, pois desempenha ações importantes na estrutura e função das teias alimentares bentônicas costeiras, além de ser uma das espécies de crustáceos mais cultivadas, principalmente nos EUA o que lhe confere alto valor comercial.

A literatura, há vários anos, vem demonstrando que a temperatura é um fator importante nas características macroscópicas do ciclo de muda em populações de crustáceos, pontuando principalmente que a frequência de ecdises é maior em

temperaturas mais altas e menor em temperaturas mais baixas, e que o contrário ocorre quando se considera o período de muda. Em nível molecular, o ciclo de muda tem sido estudado em diversas espécies, incluindo sua regulação hormonal e as vias de sinalização responsáveis pela inibição e indução da ecdise. Entretanto, o elo entre o ciclo de muda em nível gênico, proteico e até mesmo hormonal com a temperatura tem sido pouco investigado, particularmente em *C. sapidus*.

Esta espécie é considerada um organismo não-modelo que, entre outros pontos, apresenta um baixo nível de caracterização molecular, o que dificulta o uso de algumas técnicas para o entendimento da fisiologia do animal. Graças ao avanço das tecnologias, as ômicas vêm sendo utilizadas para, em primeiro lugar caracterizar os organismos em diversos níveis biológicos e, em segundo explorar as respostas fisiológicas dos indivíduos frente às condições experimentais. *C. sapidus* não possui genoma sequenciado, mas através da proteogenômica, foi possível utilizar dados de transcriptoma da espécie, já disponíveis na literatura, para a predição de proteínas gerando assim um banco de dados proteicos para *C. sapidus*.

Diante disto, este estudo trará informações importantes para o entendimento dos eventos de inibição e indução da ecdise em diversos níveis fisiológicos, quando os animais são expostos a temperaturas baixas e altas. Além de trazer em primeira mão o perfil proteico do pedúnculo óptico de animais em dois estágios de muda, intermuda e pré-muda na temperatura ótima de 24°C e em desafios térmicos de 19°C (5°C a menos da temperatura controle) e 29°C (5°C acima da temperatura controle).

De acordo com o acima exposto, nós hipotetizamos que espécimes de *Callinectes sapidus* submetidos a temperatura abaixo da temperatura controle apresentariam características moleculares, hormonais e morfológicas indicativas da inibição do ciclo de muda e conseqüente atraso na ecdise. Ao contrário do que esperamos para a temperatura

acima da temperatura controle, onde essas mesmas características estariam relacionadas ao avanço no ciclo de muda que culminaria na ecdise. Supomos também que irão ocorrer alterações na expressão de proteínas do pedúnculo óptico dependentes dos estágios de muda e das condições térmicas testadas no estudo, o que nos ajudará a inferir outros processos fisiológicos que estariam sendo afetados por estas condições.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o efeito de temperatura sobre o sistema neuroendócrino de *Callinectes sapidus* durante o ciclo de muda.

3.2. Objetivos específicos

Investigar possíveis diferenças morfológicas, através de análises histológicas do hepatopâncreas, quantificar variações nos níveis de ecdisteroides e metabólitos na hemolinfa e estimar diferenças na expressão de genes das vias de indução e inibição da ecdise, e de proteínas de choque térmico no sistema neuroendócrino de *Callinectes sapidus* em intermuda e pré-muda submetidos a diferentes condições térmicas;

1. Construir um banco de dados proteicos a partir do transcriptoma completo disponível na literatura da espécie *C. sapidus*;
2. Comparar o proteoma do pedúnculo óptico entre indivíduos em intermuda e pré-muda submetidos a diferentes condições térmicas.;

4. METODOLOGIA

4.1. Animais e manutenção

Os espécimes machos adultos de *Callinectes sapidus* (peso médio de $61,58 \pm 19,68$ g e largura média da carapaça de $9,15 \pm 0,77$ cm) foram obtidos de pescadores na cidade de Iguape, SP, transportados até o laboratório de Fisiologia Comparativa da Pigmentação no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, e separados equitativamente em 5 tanques com 10 litros de água do mar artificial (água destilada e sal marinho – Veromar, Campinas, SP, Brasil) com salinidade de 10 ‰ em um sistema de recirculação aberta. Durante o período de manutenção/aclimatação, de pelo menos 3 dias, os animais permaneceram no sistema com temperatura do ar/água de 24°C e em fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro (12:12 LD), com o início do período de claro às 8 horas e início da fase de escuro às 20 horas. A intensidade luminosa do sistema foi de 100 lux (LED 3528, à prova de água, marca 88 Lights, Brasil, luz branca, 420 a 750 nm) mensurada com o auxílio de um luxímetro (LX-102, Lutron Eletronic Enterprise, Taipei, Taiwan). Os animais foram alimentados em dias alternados com carne bovina e a manutenção e experimentação animal foram autorizadas pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (licença SISBIO número 67295–3).

4.2. Delineamento experimental

Após o período de aclimação, os animais foram transferidos para um sistema de recirculação fechada de aproximadamente 60 litros de água do mar artificial (água destilada e sal marinho – Veromar, Campinas, SP, Brasil) com salinidade de 10 ‰, que consistia em 8 aquários conectados a um *sump* com filtragem mecânica (perlon e malha de plâncton), biológica (5 kg de biocerâmica – *Ocean Tech, Professional Aquarium*, Porto Alegre, SP, Brasil) e luz ultravioleta (filtro Atman – 36W, Guangdong, China). O fotoperíodo manteve-se constante (12:12 LD), com o início e o fim do período de claro iguais ao de aclimação. Cada grupo experimental foi submetido a temperaturas de água

diferentes, sendo elas: 19°C (5°C a menos da temperatura controle), 24° (temperatura controle) e 29°C (5°C acima da temperatura controle).

Os animais utilizados nos experimentos foram selecionados de acordo com os níveis de ecdisteroides e sinal morfológico que indicavam os estágios de intermuda e pré-muda. Após identificados e distribuídos nos sistemas de experimentação, a hemolinfa foi coletada no início de um período de 5 dias (tempo experimental) e então submetidos, cada grupo, ao seu desafio térmico. Ao final do 5° dia, a hemolinfa foi novamente retirada e os animais eutanasiados 2 horas após o acender das luzes (10 horas) (Figura 3).

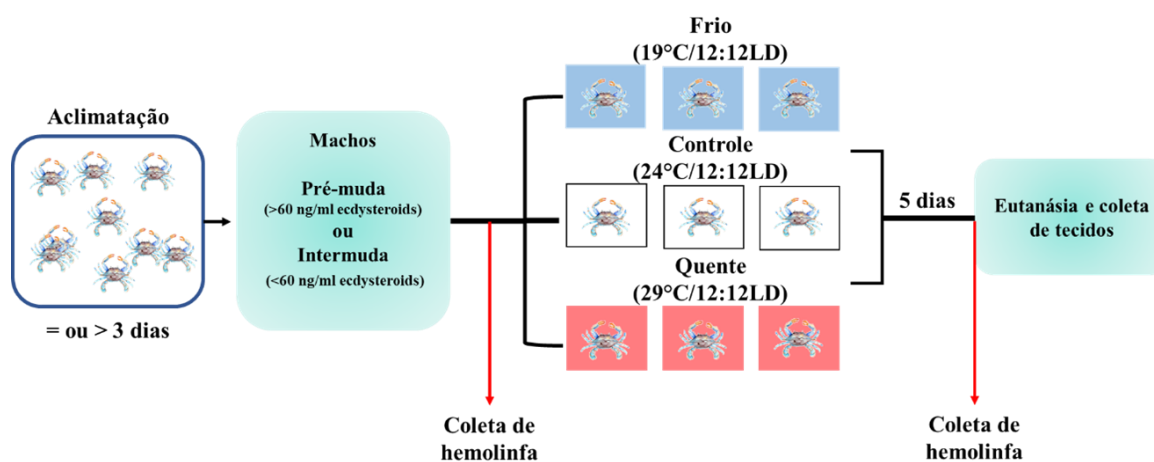


Figura 3. Esquema do desenho experimental. A aclimação foi realizada com os espécimes agrupados. Após a individualização dos indivíduos, a hemolinfa inicial foi obtida e os mesmos foram submetidos, imediatamente, às condições experimentais. Ao fim do período de experimentação, a hemolinfa final foi obtida seguida por eutanásia e coleta dos tecidos.

4.3. Eutanásia e obtenção das amostras

A hemolinfa foi coletada no 1° e 5° dia do tempo experimental com uma seringa de insulina inserida na membrana artrodial do 5° pereiópodo. Volumes de 150 a 300 µL foram retirados e transferidos para um tubo contendo EDTA-K3 (FirstLab, São José do Pinhais, PR, Brasil) para evitar a coagulação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4000 x g por 4 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo correspondente a cada amostra e congelado a -80°C. Após a retirada final da hemolinfa (5° dia do experimento), o animal foi submetido a eutanásia. Uma dose de 20

mg/kg de cetamina (Dopalen, CEVA, Paulínia, SP, Brasil) foi administrada por via intracardiaca, sendo injetada na linha média da membrana artrodial da dobradiça da carapaça e direcionada dorsalmente para o sulco cervical, onde o seio pericárdico está situado (Quesada et al., 2011).

As amostras dos órgão-Y (YO), dos pedúnculos ópticos e do hepatopâncreas (HP) foram excisadas e imediatamente preservadas em nitrogênio líquido. Antes da preservação, a cutícula e a retina foram removidas dos pedúnculos ópticos, mantendo-se apenas a parte nervosa que inclui o órgão-X/glândula do seio. Duas porções do HP localizadas próximas ao gânglio torácico foram excisadas e uma delas foi imersa em solução de formol 10% para posterior processamento histológico.

4.4. Imunoensaio para ecdisteroides

O método para quantificar ecdisteroides foi desenvolvido por Mark R. Brown e David McKinney (McKinney et al., 2017), disponível em <https://www.kerafast.com/productgroup/835/anti-ecdysteroid-e20e-antibodies-and-antigens>). Essa técnica foi utilizada em conjunto com a observação do sinal morfológico para determinar os estágios de muda, bem como o efeito da temperatura sobre os níveis circulantes do hormônio. Para isso realizamos a validação do método que consistiu em um painel de combinações planejado com quatro diluições do anticorpo primário (1:333; 1:1000; 1:3000; e 1:9000) e quatro do anticorpo secundário (1:3700; 1:7400; 1:14800; e 1:29600), para detecção das concentrações máxima (2000 pg/25 µL) e mínima (4 pg/25 µL) do hormônio. Depois de obtermos o valor de OD menor que 1 para a menor concentração, a diferença das médias de OD de 5 vezes entre as concentrações, e o R² da curva padrão igual ou próximo a 1, selecionamos então as concentrações dos anticorpos e consideramos o protocolo válido, conforme descrito a seguir. Este ensaio foi utilizado

para a discriminação dos estágios de muda dos espécimes coletados e para dosagem do hormônio nos momentos inicial e final dos experimentos.

O primeiro dia do ensaio consiste na incubação *overnight* de 100 μL de ecdisteroide conjugado a albumina sérica bovina (ECD-BLg, Kerafast, Boston, MA, USA) na concentração de 1:1375 μL em PBS 1X (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 em 1 litro, com pH ajustado para 7,4) em placa *high-binding* de 96 poços (Corning, Glendale, AZ, USA) a 4°C sem agitação em um recipiente de plástico tampado com papel toalha úmido no fundo, para manter a placa hidratada. O segundo dia inicia-se com 2 lavagens em PBS-Tween 0,05% e em seguida a adição de 25 μL por poço de PBS-MB filtrado (PBS 1X mais 0,4% de leite em pó desnatado = solução de bloqueio). A curva padrão de ecdisteroides para o ensaio consiste de 2000 pg/25 μL até 4 pg/25 μL através de uma diluição seriada de 2 vezes, utilizando PBS-MB filtrado. Seguiu-se então a adição de 25 μL das soluções da curva padrão, amostras e controles em duplicata e, por fim, 50 μL de anticorpo primário anti-ECD (EAB27 – Kerafast, Boston, MA, USA) a partir de uma solução estoque de 1:1 anticorpo:glicerol seguida de diluição de 1:3000 em PBS-MB filtrado. Os poços respectivos ao branco da placa não receberam o anticorpo primário, o qual foi substituído por 50 μL de PBS-MB filtrado. A incubação foi feita *overnight* a 4°C sem agitação em um recipiente de plástico tampado com papel toalha úmido no fundo, para manter a placa hidratada.

No terceiro dia, 2 lavagens de PBS-Tween 0,05% foram realizadas, e 100 μL de anticorpo secundário ligado à peroxidase (Jackson ImmunoLab, West Grove, PA, USA) a partir de uma solução estoque de 1:1 anticorpo:glicerol seguida de diluição de 1:7400 em PBS-MB filtrado, anteriormente trazido para a temperatura ambiente, foram adicionados a todos os poços da placa, incluindo o branco. A incubação foi feita em temperatura ambiente por 3 h sem agitação em um recipiente de plástico tampado com

papel toalha úmido no fundo. A seguir, a placa foi lavada (2X) com PBS-Tween 0,05% e a ela foram adicionados 100 µL de substrato TMB (Invitrogen, Waltham, MA, USA) em todos os poços por 10 a 30 min, até a cor azul aparecer, quando se adicionou a solução de parada (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) e a leitura foi feita prontamente em leitor de ELISA a 450 nm.

4.5. Dosagem de metabólitos

As concentrações de colesterol e triglicérides foram obtidas da hemolinfa coletada ao final dos 5 dias de exposição às diferentes temperaturas. Utilizamos kits comerciais (Labtest®, Lagoa Santa, MG, Brasil) para cada metabólito seguindo o protocolo do fabricante, que consiste em um sistema enzimático colorimétrico com mensuração quantitativa de *endpoint* das amostras. O princípio deste ensaio baseia-se na hidrólise de ésteres de colesterol pela colesterol-esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol é então oxidado e o produto final tem absorvância máxima em 500 nm.

4.6. Histologia do hepatopâncreas

Como citado anteriormente, uma porção do hepatopâncreas foi imersa em 5 mL de formol 10% e após 48 h, foi transferida para um novo tubo contendo 5 mL de etanol 70%. Os tecidos permaneceram no álcool até o envio das amostras à empresa HistoCell (São Paulo, Brasil), responsável pelos cortes histológicos e coloração hematoxilina-eosina. As lâminas histológicas foram analisadas e as imagens foram obtidas utilizando-se um sistema computadorizado para a captura de imagens incluindo microscópio óptico DM1000, câmera DFC295 e programa LAS V3.8 (Leica, Wetzlar, Hesse, Alemanha).

4.7. Expressão gênica

4.7.1. Extração e purificação do RNA

O RNA total foi extraído das amostras previamente congeladas em nitrogênio líquido. Os tecidos foram homogeneizados em tubos contendo 1 g de *beads* de zircônio (D1032-15, Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA) e 300 µL (para pedúnculo óptico e YO) ou 500 µL (para hepatopâncreas, HP) de Trizol (Ambion, Austin, TX, USA) em um homogeneizador refrigerado (BeadBlaster 24R/ D2400-R, Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA) com os seguintes parâmetros: 3 ciclos de 30 s com pausa de 30 s, a 3650 rpm, 6 m/s, a 4°C. A seguir, o volume de trizol foi completado para 1 mL, e a solução incubada por 5 min em temperatura ambiente. Após uma breve centrifugação em centrífuga de bancada, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo correspondente ao qual foram acrescentados 200 µL de BCP (1-bromo-3-cloropropano, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), seguido por agitação vigorosa de 15 s e incubação por 2 min a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 x g por 15 min a 4°C, a fase superior (~500 µL) que contém RNA foi transferida para um novo tubo. O RNA total foi precipitado com a adição de 500 µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA), incubado por 10 min a 4°C, seguido de centrifugação a 12000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75% e agitação em *vórtex*, com posterior centrifugação por 5 min a 7500 x g a 4°C. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* evaporado em temperatura ambiente e ressuspenso em 20 a 50 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (H₂O DEPC, Ambion, Austin, TX, USA).

4.7.2. Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR)

A concentração (OD₂₆₀ nm) e a qualidade do RNA total (OD₂₆₀ nm/OD₂₈₀ nm) foram determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, ThermoFisher,

Waltham, MA, USA). A qualidade do RNA foi ainda conferida através de uma corrida (100 V por 30 min) em gel de agarose (2%), cuja integridade foi demonstrada pelo aparecimento único das bandas dos RNA ribossômicos 28S e 18S. A síntese de cDNA ocorreu em duas etapas de reações. Na primeira etapa, utilizaram-se 1 µg de RNA, 1 µL de *primers* randômicos (100 ng/µL), 1 µL de dNTPs (10 mM) (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) e água DEPC para ajustar o volume final para 13 µL a 65°C por 5 min. Após esse tempo, os tubos foram colocados em gelo e a eles foram adicionados 1 µL de DTT (0,1 M), 1 µL de inibidor de ribonuclease (40 U/µL), 0,5 µL da enzima *Superscript III RT* (200 U/µL), 4 µL de *PCR buffer* (5X) e 0,5 µL de água DEPC obtendo-se um volume final da reação de 20 µL. A segunda etapa consistiu de 5 min a 25°C, 50 min a 50°C e 15 min a 70°C. As reações foram realizadas no termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e as amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

4.7.3. PCR quantitativo (*qPCR*)

Para a análise quantitativa da expressão de cada gene as amostras foram corridas em duplicata. *Primers* específicos para os genes de interesse e o ribossômico *RPL12* (utilizado como normalizador) (Tabela 1) foram desenhados com o *PrimerBlast* com base nas sequências do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) e sintetizados pela IDT (Coralville, IA, USA).

Tabela 1. Sequências dos primers e números de acesso dos RNAm utilizados para as reações de PCR quantitativo

Templates	Sequences
<i>CasRPL12</i> Yednock et al., 2015	For.: 5'-CAGCTTACAAGAGCACCGGA-3' Rev.: 5'-TTTCTGACTGACCGTTGCGT-3'

<p><i>CasEcR</i> HQ630857.1 HQ630859.1 HQ630858.1 JQ771939.1</p>	<p>For.: 5'-GAGTGAAGACCTGGCACAGT-3' Rev.: 5'-TCAAAAGCCGCCACTGAGAA-3'</p>
<p><i>CasMIH</i> KJ813010.1</p>	<p>For.: 5'-CAGCTTACAAGAGCACCGGA-3' Rev.: 5'-TTTCTGACTGACCGTTGCGT-3'</p>
<p><i>CasCHH</i> AY536012.1</p>	<p>For.: 5'-GCCAGTGGATGCAGATCAAAC-3' Rev.: 5'-ACTTCTTGCCGACAACCTGTA-3'</p>
<p><i>CasCG-YO1</i> AY785292.1</p>	<p>For.: 5'-TCTACGTGGGCCACAGAAAC-3 Rev.: 5'-CTGCACTCCTTCTGGTTCGT-3</p>
<p><i>CasHSC70</i> DQ663760.1</p>	<p>For.: 5'-TGCAACCCCATCATCACCAA-3 Rev.: 5'-TGTGTGCCTTGGGACTTGAG-3</p>
<p><i>CasHSP90</i> DQ667139.1</p>	<p>For.: 5'-AACATCAAGCTGGGCATCCA-3 Rev.: 5'-GAACCTGTTACGGCTCTCA-3</p>

As reações de PCR quantitativo seguiram o protocolo para o fluoróforo Syber Green, onde cada solução independente para cada gene de interesse ou para o normalizador *CasRPL12* contém 300 nM dos *primers forward e reverse*, KAPA SYBR FAST 2x (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) e água *DNase/RNasefree* (Ambion, Austin, TX, USA). As reações foram realizadas em um termociclador iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) nas seguintes condições: 10 min a 95°C, seguido de 45 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 60°C, e, por fim, 80 ciclos de 10 s a 55°C, com aumento gradativo de 0,5°C por ciclo.

4.8. Análises estatísticas

A expressão gênica foi quantificada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001). O ΔC_T de cada reação de qPCR foi determinado subtraindo o C_T do normalizador do C_T do gene de interesse. Para obter o $\Delta\Delta C_T$, foi subtraído de todos os

valores dos outros grupos e órgãos o valor médio obtido para *CasHSC70* e *CasHSP90* no YO de animais em intermuda na temperatura controle (24°C), para *CasEcRs* o valor médio obtido no hepatopâncreas de animais em pré-muda na temperatura controle, e para os demais genes o valor médio obtido do grupo dos animais de intermuda na temperatura controle. Esses valores foram colocados como o exponencial negativo na base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Todos os resultados de qPCR foram submetidos à análise de *outlier* usando os valores após a segunda transformação dos dados ($2^{-\Delta\Delta CT}$) através do método ROUT com Q =10%.

Para determinar o efeito da temperatura sobre os níveis circulantes de ecdisteroides, os valores de concentração do hormônio no final do experimento foram subtraídos dos valores iniciais, obtendo-se o Δ de concentração. As concentrações foram expressas em ng/mL e comparadas por teste *t* pareado.

Para todos os protocolos experimentais apresentados acima, os resultados foram comparados por Two-Way ANOVA, para verificar a influência de cada fator (temperatura e estágio de muda) ou a interação entre eles, seguida de pós-teste de Bonferroni para a comparação entre as temperaturas em um mesmo estágio ou entre os estágios de muda em uma mesma temperatura. Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da expressão gênica ou das concentrações hormonais e de metabólitos, e o valor $p < 0,05$ foi estabelecido para refutar a hipótese nula. Todas as análises foram executadas no software GraphPad Prism 8.0.

O processo de análise dos resultados da proteogenômica comparativa encontram-se descritos junto a descrição da técnica, para uma melhor compreensão.

4.9. Proteômica (feita em colaboração com Dr. José Thalles Lacerda)

4.9.1. Extração proteica e digestão triptica com o método de preparação assistido por filtro (Filter-Aided Sample Preparation, FASP)

Os pedúnculos ópticos de *C. sapidus* nos estágios de pré-muda e intermuda sob as 3 temperaturas experimentadas neste estudo (n=4 por grupo experimental) foram homogeneizados em tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 7,8, 3% SDS, 150 mM NaCl) suplementado com inibidores de proteases e de fosfatases (cOmplete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free e PhosSTOP™ tablets, respectivamente Roche Life Science, Indianapolis, IN, USA), em um homogeneizador *bead blaster* refrigerado (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA) em velocidade máxima de 3650 rpm com 3 ciclos de 30 s *on-and-off* a 4°C. As amostras foram envoltas em gelo e sonicadas por 3 ciclos (pulsos de 10 s com pausas de 30 s) na potência de 20% usando o sonicador Ultrasonic Pulse 150 (Benchmark Scientific, Sayreville, NJ, USA) e então centrifugadas a 16000 x g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada com o kit BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher, Waltham, MA, USA). Aliquotas de lisados contendo 250 µg de proteína total foram reduzidos com 200 mM de ditioneitol (DTT, Cytiva™, Marlborough, MA, USA), adicionado às amostras 1:1 (v/v), aquecidas a 90°C por 10 min e resfriadas à temperatura ambiente. Subsequentemente, o lisado proteico foi diluído para <0,3% SDS com tampão de ureia (8 M ureia em 100 mM de NH₄HCO₃) e inseridos nas unidades de filtro de centrifugação Microcon de 10 kDa (Merck Millipore, Burlington, MA, USA) para preparo de amostra pelo método FASP a 10000 x g por 50 min a 20°C (Wiśniewski, 2016; Wiśniewski et al., 2009, 2011). As unidades de filtro e os tubos coletores usados no método FASP foram previamente passivados por incubação *overnight* com Tween-20 5% (v/v) para reduzir a perda de peptídeos e proteínas por ligação hidrofóbica não específica (Erde et al., 2014).

No procedimento experimental realizado com o FASP, as amostras coletadas foram inseridas em filtros e centrifugadas para concentrar as proteínas e a seguir foram lavadas (1X) com 200 µL de tampão de ureia. Então, 200 µL de 50 mM de iodoacetamida

(IAA, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) em tampão de ureia foram adicionados e a solução agitada por 5 min a 600 rpm no escuro. Alquilação (transferência do radical alquil da iodoacetamida para o grupo tiol das cisteínas das proteínas reduzidas) foi feita por 25 min a temperatura ambiente no escuro. Os filtros foram centrifugados e lavados com 200 μ L de tampão de ureia (2X) e lavagens adicionais com 100 mM de NH_4HCO_3 (3X). Os filtros foram então colocados em novos tubos *eppendorfe* e 100 μ L de 50 mM de NH_4HCO_3 foram adicionados aos filtros. A digestão proteica realizada com tripsina (grau de sequenciamento, Promega Corporation, Madison, WI, USA) foi feita nos filtros na proporção enzima:proteína de 1:50 (w/w) por 12 h a 37°C, seguida por um passo de digestão por tripsina na proporção de 1:100 (w/w) resultando em uma duração total de digestão de 18 h. Os peptídeos foram passados pelos filtros os quais foram lavados (3X) com 100 μ L de 3% acetonitrila (ACN) em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) para maximizar a recuperação de peptídeos. As amostras foram acidificadas em uma concentração final de 2% de TFA e os peptídeos foram purificados por cromatografia de fase reversa usando ponteiros C18 (TopTip™, PolyLC Inc, Columbia, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos foram secados sob vácuo e estocados a -20°C. As amostras de todos os grupos foram processadas simultaneamente.

4.9.2. Análise por nano-cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas - ionização por eletrospray - em modo sequencial (nanoLC-ESI-MS/MS)

Os peptídeos secos foram ressuspensos em 5 μ L de ácido fórmico 0,1% em água e analisados em um sistema de cromatografia líquida HPLC Easy-nLC 1200 UHPLC (Thermo Scientific, Bremen, Germany) acoplado a um espectômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos (Thermo Scientific, Bremen, Germany). As amostras de todos os grupos foram analisadas em conjunto. A separação de peptídeos foi feita com um gradiente linear

de solvente A (ácido fórmico 0,1% em água) e solvente B (ACN 80% em ácido fórmico 0,1% em água), e 5 µL da mistura de peptídeos foram colocados em uma coluna (Acclaim PepMap 100, C18, 3 µm, 75 µm × 2 cm, nanoViper, Thermo Scientific, Bremen, Germany) a 500 bar. Após esta etapa, os peptídeos coletados foram eluídos em colunas C18 (Acclaim PepMap RSLC, C18, 2 µm, 75 µm × 15 cm, nanoViper, Thermo Scientific, Bremen, Germany) em uma taxa de fluxo de 300 nL/min. Os peptídeos foram eluídos usando um gradiente linear de 5–28% do solvente B por 80 min seguido por um gradiente linear de 28–40% do solvente B por 10 min. Finalmente, a porcentagem de solvente B foi aumentada para 95% em 2 min e a coluna foi lavada por 12 min com esta proporção de solvente. A requilibração do sistema com 100% do solvente A foi feita antes de cada injeção. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas em espectrômetro Orbitrap Fusion Lumos usando uma fonte iônica nanospray Flex NG (Thermo Scientific, Bremen, Germany), e operando em modo positivo em *electrospray* (ESI) com uma temperatura capilar de 300°C, e nível S-Lens RFa 30%. Um escaneio completo do MS foi seguido por escaneios de MS2 em modo dependente de dados (*data-dependent acquisition*, DDA) em ciclos de 3 s. Ambos os escaneios MS e MS2 foram feitos no analisador Orbitrap. Íons precursores selecionados para MS2 foram excluídos para escaneios subsequentes por 40 s. Íons precursores foram fragmentados por dissociação de colisão por alta energia (*higher energy collision dissociation*, HCD), com energia de colisão normalizada em 30%. A resolução para o modo completo de escaneio foi programado para 120000 (a m/z 200) e o alvo controle de ganho automático (AGC) a 5×10^5 . A faixa de 350–1550 m/z foi monitorada. Para medidas de massa precisas, a opção *lock mass* foi feita no escaneio de MS e os íons de polidimetilciclosiloxano ($m/z = 445,12003$) foram usados para calibração interna em tempo real. Cada escaneio completo

foi seguido de aquisição MS2 dependente de dados com uma resolução de 30000 (a $m/z=200$), tempo máximo de enchimento de 54 ms, e janela de isolamento de 1,2 m/z .

4.9.3. Construção de banco de dados personalizado de sequências proteicas de *C. sapidus*

O transcriptoma completo de *C. sapidus* foi construído por Gao e colaboradores (2022) e os 66.780 transcritos de alta qualidade obtidos estavam disponíveis em um conjunto de dados apresentado naquele estudo. Realizamos o processamento e análise dos dados usando ferramentas disponíveis no European Galaxy webserver (<https://usegalaxy.eu/>) (Afgan et al., 2016) e um fluxo de trabalho multinível foi aplicado para aumentar as previsões potenciais de sequências proteicas, conforme demonstrado na Figura 4.

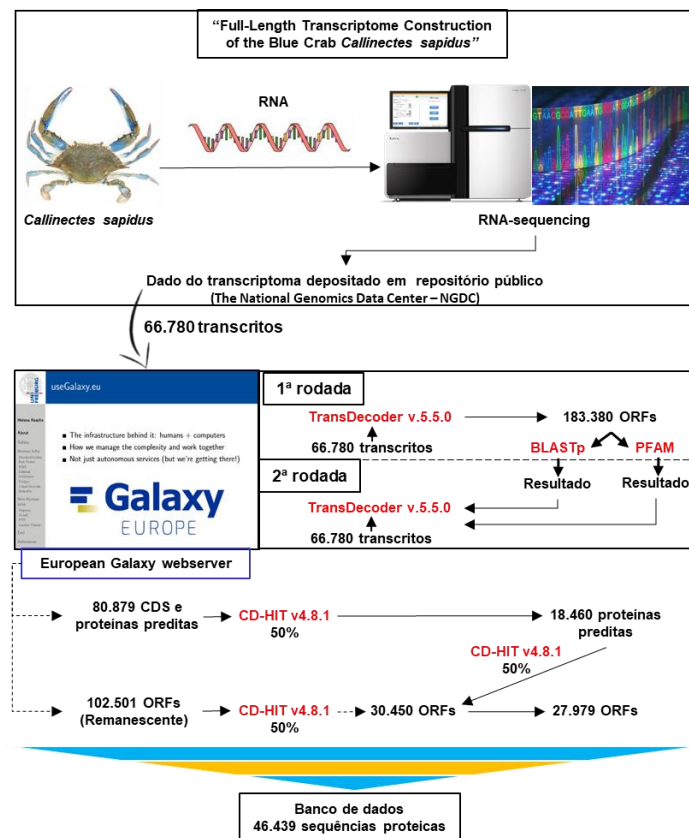


Figura 4. Representação gráfica do fluxo de trabalho realizado para construção do banco de dados de sequências proteicas de *C. sapidus* obtido a partir de um transcriptoma da espécie.

Inicialmente, os 66.780 transcritos candidatos foram colocados no TransDecoder v.5.5.0 para encontrar os *Open Reading Frames* (ORFs) potenciais com um comprimento de pelo menos 100 aminoácidos (ORFs mais longas – sequências proteicas) dentro do conjunto de transcritos candidatos. As 183.380 ORFs mais longas foram analisadas para identificar possíveis domínios proteicos através do banco de dados PFAM-A (baixado em 31 de janeiro de 2023) usando HMMscan (v3.3.2), e também foram submetidos a busca de homologia contra 1.124.130 sequências proteicas (568.744 da UniProtKB/Swiss-prot e 662.794 da UniProtKB/TrEMBL do subfilo Crustacea - baixado em 29 de janeiro de 2023) usando BLASTp v2.10.1.

Finalmente, os transcritos candidatos foram resubmetidos ao TransDecoder e os resultados da análise pelo PFAM e BLASTp foram usados para assegurar que aquelas proteínas com *hits* de domínio proteico ou de homologia pelo *blast* fossem escolhidas para selecionar os ORFs com maior potencial codificante e funcional. Após a análise, 80.879 ORF tiveram suas sequências codificantes (CDS) e as respectivas sequências proteicas preditas obtidas. Neste caso, estas sequências preditas podem ser proteínas homólogas para outras espécies de acordo com a similaridade e domínios conservados das sequências proteicas usadas na comparação. Em seguida, as 80.879 entradas de proteínas obtidas foram submetidas ao CD-HIT (v4.8.1) para o agrupamento de sequências com identidade de 50% (-n 3 -c 5), resultando em 18.460 sequências proteicas.

Dado que a anotação do genoma de espécies de crustáceos permanece incompleta, que *C. sapidus* é um organismo não modelo, e que peptídeos podem ser codificados por muitos transcritos que não têm ORF conservada (denominados RNAs longos não codificadores, lncRNAs), por não ter função conhecida e/ou não apresentam as propriedades típicas de RNAs codificadores de proteínas bem caracterizados (Ruiz-Orera et al., 2014; Zhang et al., 2021), nós agrupamos as 102.501 ORFs remanescentes e

filtramos usando CD-HIT (v4.8.1) com uma identidade de sequência de 50% (-n 5 -c 5) resultando em 30.450 ORFs. Para evitar redundâncias, estes ORFs foram, em seguida, comparados às 18.460 sequências proteicas com CDS preditos através de uma identidade de 50% (-n 3 -c 5). Como resultado, um banco de dados personalizado foi gerado contendo 46.439 sequências proteicas (18.460 preditas pelos bancos de dados com CDS e 27.978 por ORFs não-canônicos).

4.9.4. Pesquisa de banco de dados, quantificação livre de marcadores (*Label-free quantification, LFQ*) e análise por bioinformática

Os dados brutos (*raw*) foram inseridos no programa PEAKS X-pro (Bioinformatics Solution Inc., Waterloo, ON, Canada) e o fluxo de trabalho padrão do PEAKS (sequência de peptídeos *de novo peptide*, ferramentas PeaksDB, PeaksPTM, e SPIDER) foi aplicado à análise multinível (*multi-round*) para identificação de proteínas (Ma e Johnson, 2012; Zhang et al., 2012). Inicialmente, os espectros MS/MS foram submetidos a uma busca usando o banco de dados personalizado de *C. sapidus* contendo 46.439 entradas de proteínas. Foram usados os seguintes parâmetros: tolerância de erro para massa do íon precursor de 15 ppm; tolerância de erro para o íon de fragmentação de 0,02 Da; tripsina foi configurada como a enzima específica e até 2 clivagens perdidas foram aceitas; carbamidometilação em cisteína (Cys) foi configurada como modificação fixa e oxidação em metionina (Met) como modificação variável, permitindo até 3 modificações por peptídeo na ferramenta SPIDER. Uma taxa de descoberta falsa (*False discovery rate, FDR*) de 1% no nível de peptídeo foi programada. A seguir, sequências de peptídeos *de novo* (*de novo score* $\geq 50\%$) ainda presentes após este resultado foram resubmetidas a uma segunda análise de busca contra 91.526 entradas de proteínas representativas do banco de dados de *Brachyura* (147.419 entradas de proteínas, baixadas

de UniProt em 27 de março de 2023), resultantes do agrupamento de sequências usando CD-HIT com um limiar de identidade de sequência de 50% (-n 3 -c 0.5). Os parâmetros para a busca em banco de dados foram consistentes com aqueles da análise inicial. Os resultados finais da análise multinível foram submetidos a um FDR estabelecido para 1% nos níveis de peptídeos e proteínas. Proteínas com no mínimo 2 peptídeos únicos para sua sequência (*unique peptide*) e sendo significantes foram consideradas como identificadas.

Para análise de quantificação relativa livre de marcadores (*Label-free quantification*, LFQ), o resultado da identificação de proteínas pela ferramenta SPIDER foi submetido ao modelo PEAKS Q. O método LFQ baseia-se nos padrões LC/MS identificados por alinhamento de tempos de retenção (RT), contribuição do vetor padrão e correspondência entre corridas. Desta forma, a correspondência entre as corridas (*Match-between-runs*) é uma abordagem comum para reduzir o problema de valores ausentes na análise de LFQ, onde peptídeos identificados por espectros MS/MS em uma corrida são transferidos para outra por inferência com base em m/z , estado de carga, tempo de retenção e mobilidade iônica, quando aplicável (Yu et al., 2021) (Figura 5). As fontes de valores ausentes variam de erros de clivagem triptica à supressão de íons no espectrômetro de massa e fragmentação inadequada de MS/MS ou limitações de pesquisa de banco de dados (Hamid et al., 2022).

Na análise LFQ, uma tolerância de erro de massa (desvio entre diferentes corridas) de 15 ppm, uma tolerância de desvio de tempo de retenção de 3 min e um limiar de FDR de 1% foram aplicados sob a identificação de proteínas da ferramenta SPIDER. A normalização dos conjuntos de dados foi feita pela contagem total de íons (*Total-ion count*, TIC) e o fator de normalização obtido para cada amostra foi aplicado para calcular as áreas normalizadas das proteínas (área total sob a curva/fator de normalização, nos

quais a área total sob a curva é representada pela soma das áreas sob a curva de todos os TOP3 peptídeos específicos).

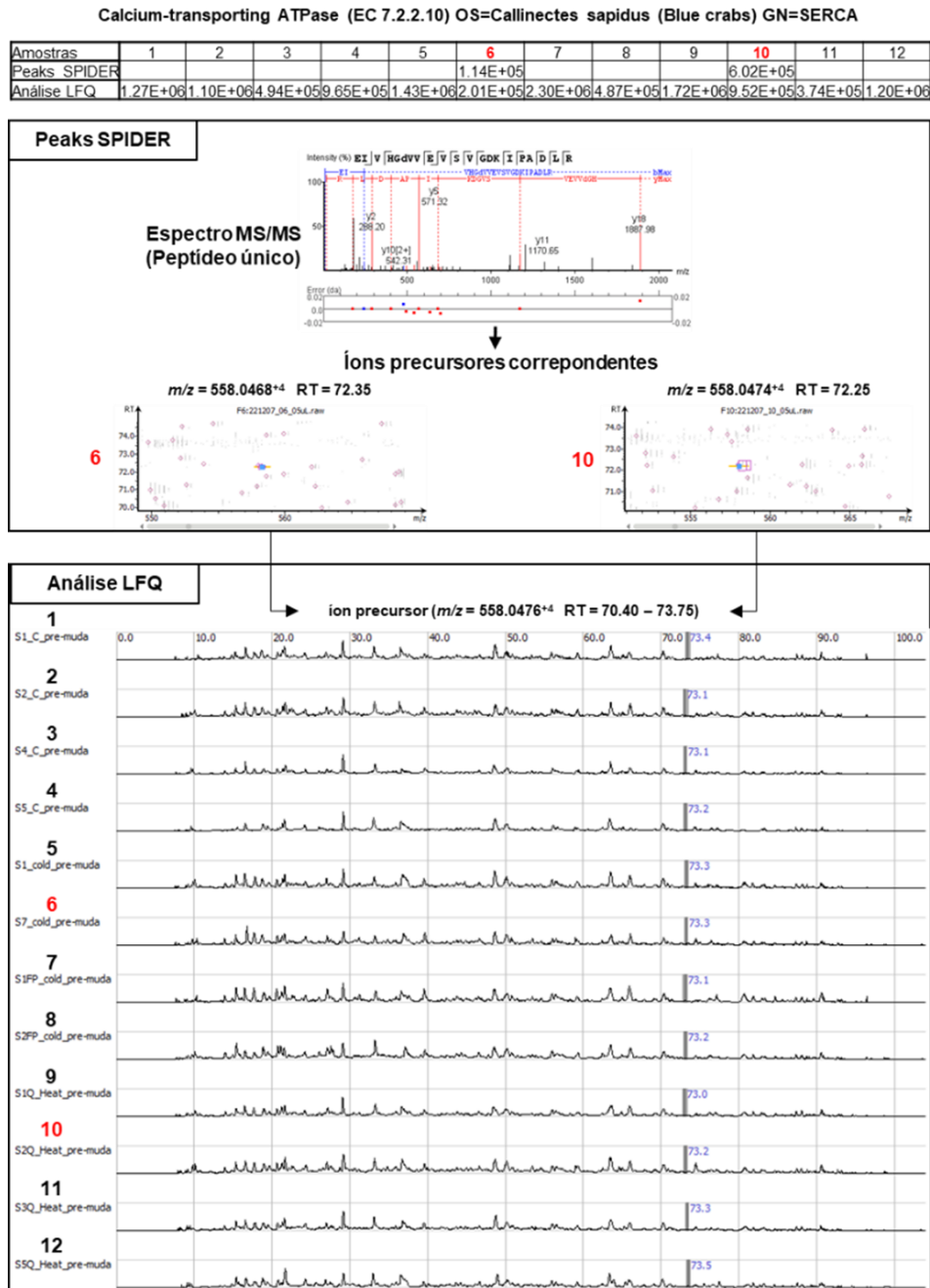


Figura 5. Exemplificação gráfica das vantagens obtidas pelo método de quantificação relativa Lfq. A ATPase transportadora de cálcio foi identificada na análise de pesquisa por homologia usando espectros MS/MS e as correspondências aos seus íons precursores apenas nas amostras 6 e 10. Após a análise Lfq e correspondência entre corridas, onde características dos íons (m/z , tempo de retenção e estado de carga) deste peptídeo previamente identificado na análise anterior foram detectadas nas demais corridas, a proteína pôde ser identificada e quantificada nestas amostras que outrora foram consideradas como valores perdidos.

Em seguida, a rejeição de *outliers* para cada proteína foi realizada quando os *outliers* do *boxplot* fossem valores superiores a 1,5 vezes o intervalo interquartil (25% e 75%) além do primeiro e do terceiro quartil (Vinutha et al., 2018) (Figura 6).

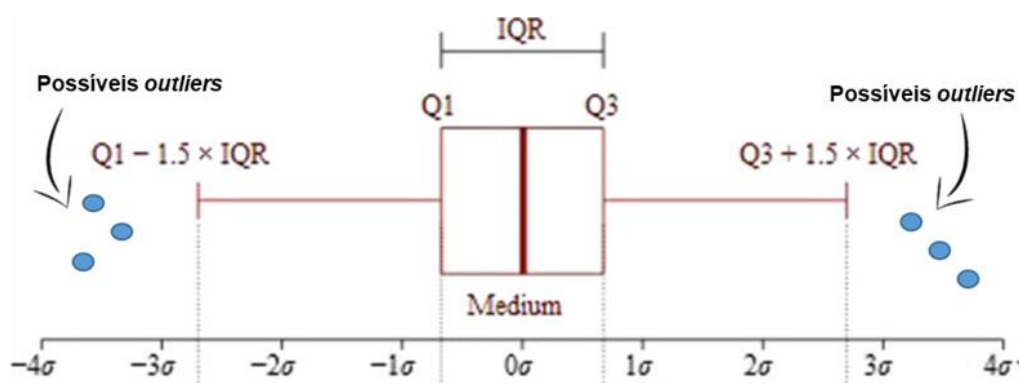


Figura 6. Representação gráfica para detecção de *outliers* baseada no intervalo interquartil (*Interquartile range*, IQR). As variáveis Q1 (primeiro quartil) e Q3 (terceiro quartil) representam 25% e 75% do intervalo, respectivamente. Adaptado de Vinutha et al., 2018.

Como a análise LFQ realiza o alinhamento de RT e os limites de detecção de peptídeos são ajustados pelas janelas deste alinhamento nas amostras em que estes peptídeos foram detectados com sucesso, algumas áreas de proteínas podem resultar em um valor de zero (0) devido à ausência de um pico adequado de peptídeos específicos para integrá-los nos resultados. Nestes casos, valores zero foram substituídos por valores médios de área sob a curva calculados a partir das replicatas remanescentes quando as proteínas foram identificadas em no mínimo 2 dentre as 4 replicatas biológicas. Então, as áreas normalizadas foram transformadas em valores com escala de \log_2 e as proteínas com diferenças significativas em sua abundância foram estimadas a partir de um valor de $p < 0,05$ usando o teste t de Student de duas caudas ou ANOVA-One Way, quando aplicável, e uma mudança de vezes em escala \log_2 (\log_2 *fold change*) com valores $x \geq 1$ e $x \leq -1$ (igual a $FC \geq 2$) para definir proteínas com codificação aumentada e diminuída, respectivamente.

A análise de agrupamento hierárquico (*Clustering*) foi realizada a partir dos perfis codificados no proteoma. Dados proteômicos foram submetidos a análise manual de anotação por ontologia gênica (*Gene Ontology*) para processos biológicos (*Gene Ontology Biological Processes*, GO-BP), funções moleculares (*Gene Ontology Molecular Function*, GO-MF) e componentes celulares (*Gene Ontology Cellular Component*, GO-CC) para caracterização do proteoma do pedúnculo ocular de *C. sapidus*, cujas informações estão descritas na base de dados UniProtKB de acordo com os IDs das proteínas identificadas. Então, a análise por GO foi realizada para identificar potenciais grupos proteicos alterados pela comparação de ontologia de gene entre grupos de amostras.

5. RESULTADOS

5.1. Histologia do hepatopâncreas

Fragmentos do hepatopâncreas foram obtidos no dia 5 de 3 indivíduos dos estágios de muda avaliados nesse estudo baseando-se nas concentrações de ecdisteroides obtidas no dia 1 do experimento. Estes tecidos foram direcionados para análises histológicas, a fim de identificar possíveis mudanças na sua morfologia sob os efeitos das temperaturas experimentais.

A análise histológica mostrou as mudanças ocorridas no hepatopâncreas dos indivíduos de intermuda (Figura 7) e pré-muda (Figura 8) submetidos às 3 temperaturas analisadas no estudo. Para os 2 estágios foi possível identificar a presença dos tipos celulares, R, F e B; além disso, há visualmente uma diferença entre os tecidos nas temperaturas em cada estágio.

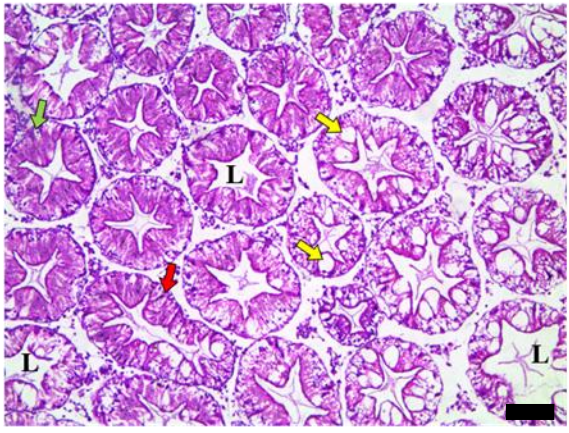
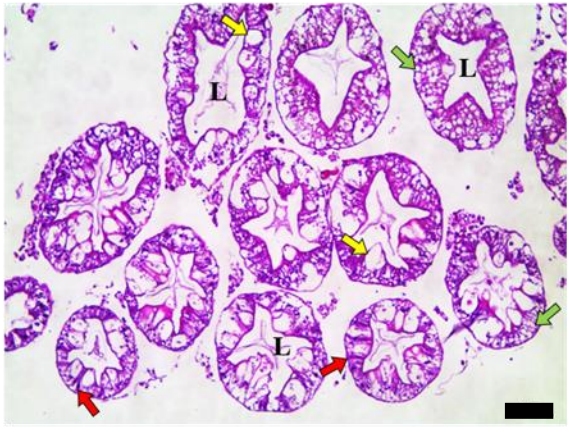
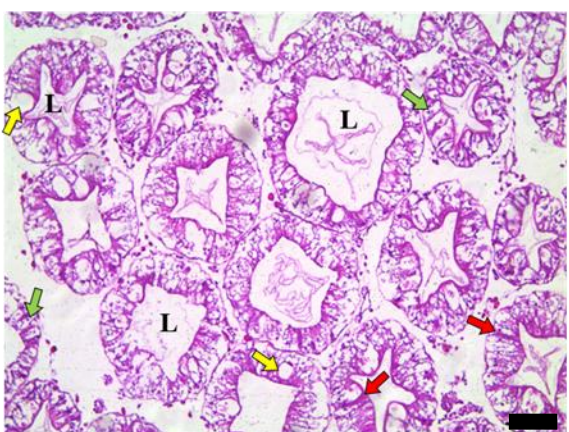
Intermuda		
Temperatura	Corte histológico	Nível final de ecdisteroides *
19°C		35,39 ng/mL
24°C		32,48 ng/mL
29°C		81,15 ng/mL

Figura 7. Imagens representativas de hepatopâncreas de espécimes de *C. sapidus* no estágio de intermuda submetidos a 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C (n=1 para cada temperatura). A coluna da direita mostra os níveis de ecdisteroides dos indivíduos ao final do experimento, momento no qual os tecidos foram coletados. Os túbulos hepatopancreáticos foram seccionados em 4 μ M, corados com hematoxilina-eosina e as imagens capturadas com aumento de 100 X. Os tipos celulares estão indicados por setas (amarela = células B, vermelha = células F, e verde = células R); L = lúmen tubular.

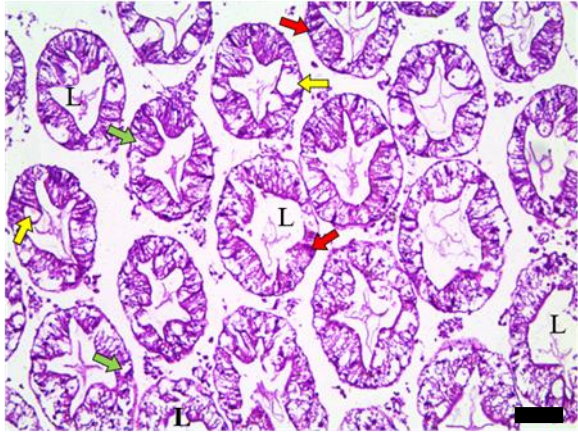
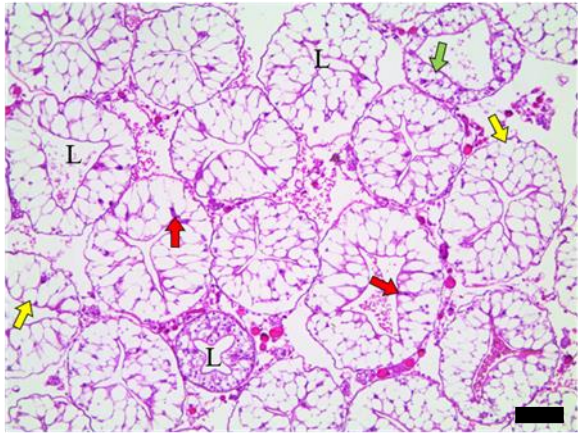
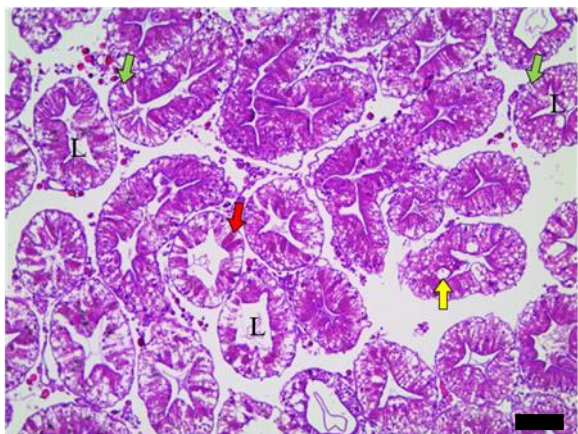
Pré - muda		
Temperatura	Corte histológico	Nível final de ecdisteroides *
19°C		40,24 ng/mL
24°C		103,45 ng/mL
29°C		135,89 ng/mL

Figura 8. Imagens representativas de hepatopâncreas de espécimes de *C. sapidus* no estágio de pré-muda submetidos a 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C (n=1 para cada temperatura). A coluna da direita mostra os níveis de ecdisteroides dos indivíduos ao final do experimento, momento no qual os tecidos foram coletados. Os túbulos hepatopancreáticos foram seccionados em 4 µM, corados com hematoxilina-eosina e as imagens capturadas com aumento de 100 X. Os tipos celulares estão indicados por setas (amarela = células B, vermelha = células F, e verde = células R); L = lúmen tubular.

5.2. Níveis circulantes de ecdisteroides e metabólitos

Quanto aos níveis de ecdisteroides a interação entre os fatores estágio de muda e temperatura foi significativa [$F(2, 23) = 11,90, p=0,0003$], segundo a análise por Two-Way ANOVA. Animais em pré-muda submetidos ao frio apresentaram uma redução nos níveis de ecdisteroides em comparação aos animais em intermuda na mesma temperatura. Na pré-muda os espécimes desafiados a 19°C também demonstraram diminuição dos níveis hormonais comparando-se aos submetidos às temperaturas controle e 29°C (Figura 9).

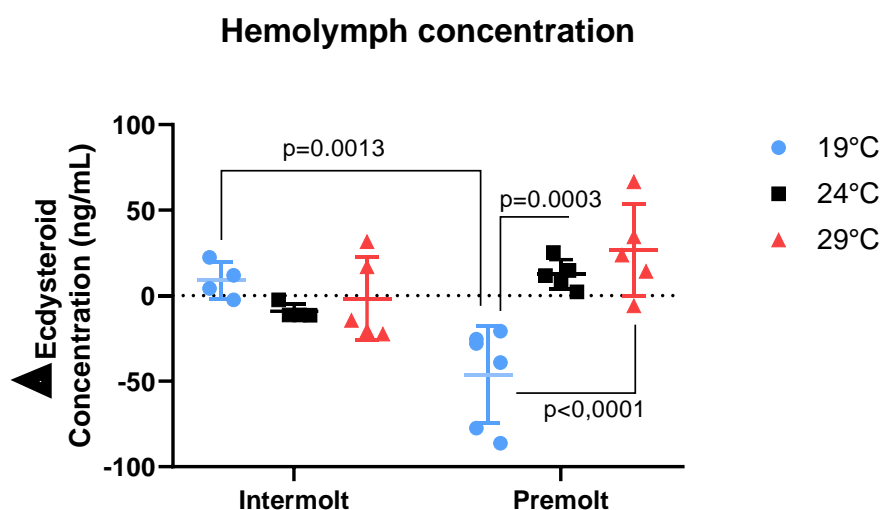


Figura 9. Delta da concentração hemolinfática de ecdisteroides (diferença entre os níveis finais e iniciais do hormônio) após os desafios térmicos de 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C sobre os animais de intermuda e pré-muda. Os valores foram comparados por Two-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. $n=4-6$.

A Tabela 2 mostra o efeito de cada temperatura sobre os grupos experimentais nos dois estágios de muda, considerando os valores médios iniciais e finais de concentração de ecdisteroides. Na intermuda, o efeito foi significativo apenas a 24°C, onde houve uma redução nos níveis hemolinfáticos do hormônio após o período experimental. Já na pré-

muda, a baixa temperatura induziu uma redução, e à temperatura de 24°C houve um aumento significativo nos ecdisteroides circulantes durante o período experimental.

Tabela 2. Efeito da temperatura sobre os níveis de ecdisteroides (média ± erro padrão da média) nos grupos experimentais nos diferentes estágios de muda. Para avaliar a significância do efeito da temperatura, os dados foram comparados por teste *t* de Student pareado.

Molt Stage	Experimental Group	Initial Ecdysteroids (ng/mL mean ± std. error of mean)	Final Ecdysteroids (ng/mL mean ± std. error of mean)	Effect	p value
Intermolt	19°C / 12:12LD	38.60 ± 6.05	47.63 ± 8.89	-	0.1908
	24°C / 12:12LD	44.50 ± 2.80	35.44 ± 1.47	Decrease	0.0262
	29°C / 12:12LD	31.59 ± 8.39	29.87 ± 14.14	-	0.8825
Premolt	19°C / 12:12LD	100.3 ± 11.86	54.20 ± 14.37	Decrease	0.0106
	24°C / 12:12LD	130.6 ± 39.15	143.2 ± 38.92	Increase	0.0289
	29°C / 12:12LD	96.58 ± 16.37	123.2 ± 9.192	-	0.0903

Dos mesmos espécimes, foram obtidos os valores de concentração dos metabólitos, colesterol e triglicérides circulantes, a fim de entender a relação da síntese de ecdisteroides e o metabolismo, ambos dependentes do colesterol. Para ambos os parâmetros, o estágio de muda exerceu um efeito significativo {colesterol [$F(1,22) = 31,40, p < 0,0001$], triglicérides [$F(1, 22) = 13,57, p = 0,0013$]}.

A concentração de colesterol é maior nos animais em pré-muda do que nos de intermuda, exceto para a temperatura mais fria, na qual não houve diferença entre os estágios. Ademais, animais em pré-muda submetidos a temperatura mais alta apresentaram os níveis circulantes mais altos em relação aos animais da temperatura mais fria (Figura 10).

Os triglicérides não sofreram variações dependentes da temperatura, porém entre os estágios os animais submetidos a condição de 29°C apresentaram níveis maiores de ecddisteroides na pré-muda em relação a intermuda.

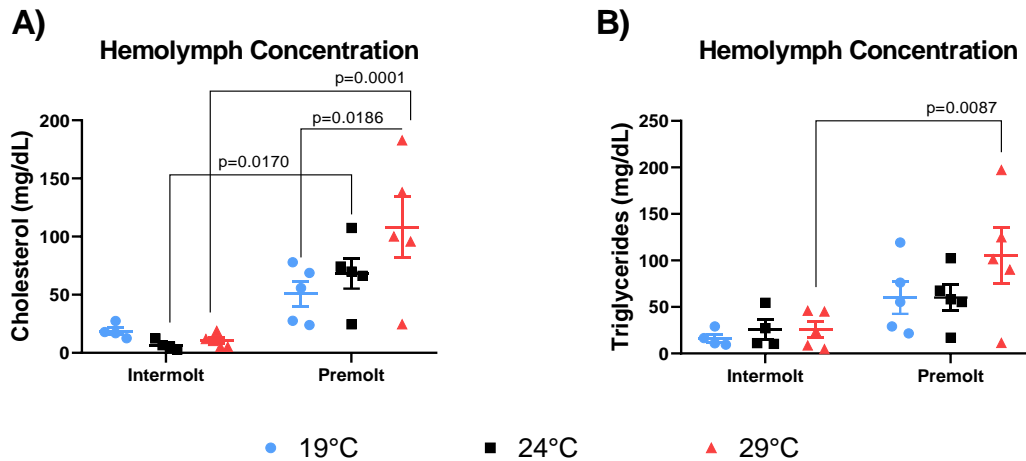


Figura 10. Níveis hemolinfáticos de colesterol (A) e triglicérides (B) nos espécimes de *C. sapidus* em inetermuda e pré-muda submetidos aos desafios térmicos de 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C. Os valores foram comparados por Two-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. $n=4-5$.

5.3 Expressão gênica

5.3.1. Proteínas de choque térmico

As proteínas de choque térmico HSC70 e HSP90, conhecidas por serem responsivas dentre outros estímulos, à temperatura, tiveram seus respectivos genes avaliados nos grupos experimentais deste estudo. A temperatura não alterou a expressão de *CasHSC70* no pedúnculo óptico (Figura 11A); no entanto, *CasHSP90* neste mesmo órgão sofreu influência do estágio de muda [$F(2, 18) = 1,753$, $p=0,0301$], sendo que na temperatura mais fria os animais de pré-muda exibiram valores de expressão menores do gene em relação aos indivíduos de intermuda (Figura 11B).

No órgão-Y, a temperatura exerceu um efeito significativo sobre a expressão de *CasHSC70* [$F(2, 19) = 7,402, p=0,0042$], confirmada pela menor expressão nos animais em pré-muda submetidos a 24°C comparados com aqueles a 19°C (Figura 11C). A expressão de *CasHSP90* também foi influenciada pelas diferentes temperaturas [$F(2, 19) = 3,910, p=0,0378$] nos animais em pré-muda: a temperatura de 19°C induziu um aumento da expressão gênica de *CasHSP90* quando comparada às outras duas temperaturas mais elevadas (Figura 11D).

Ambas as proteínas de choque térmico aqui avaliadas parecem apresentar mais alterações em sua expressão no hepatopâncreas em comparação aos outros órgãos estudados. A interação entre os fatores estágio de muda e temperatura foi significativa para *CasHSC70* [$F(2, 17) = 3,957, p=0,0388$] e *CasHSP90* [$F(2, 16) = 5,142, p=0,0189$]. A expressão de *CasHSC70* é maior nas temperaturas de 24 e 29°C nos indivíduos em pré-muda em comparação com os de intermuda nas mesmas temperaturas. Além disso, os animais na pré-muda submetidos à condição de 19°C apresentaram redução nos níveis de expressão em relação aos indivíduos expostos as temperaturas mais altas (Figura 11E). Para *CasHSP90*, os espécimes em pré-muda condicionados a 19°C e 24°C apresentaram maior expressão gênica em relação aos indivíduos de intermuda, como também em comparação com a condição de 29°C dos animais no mesmo estágio (Figura 11F).

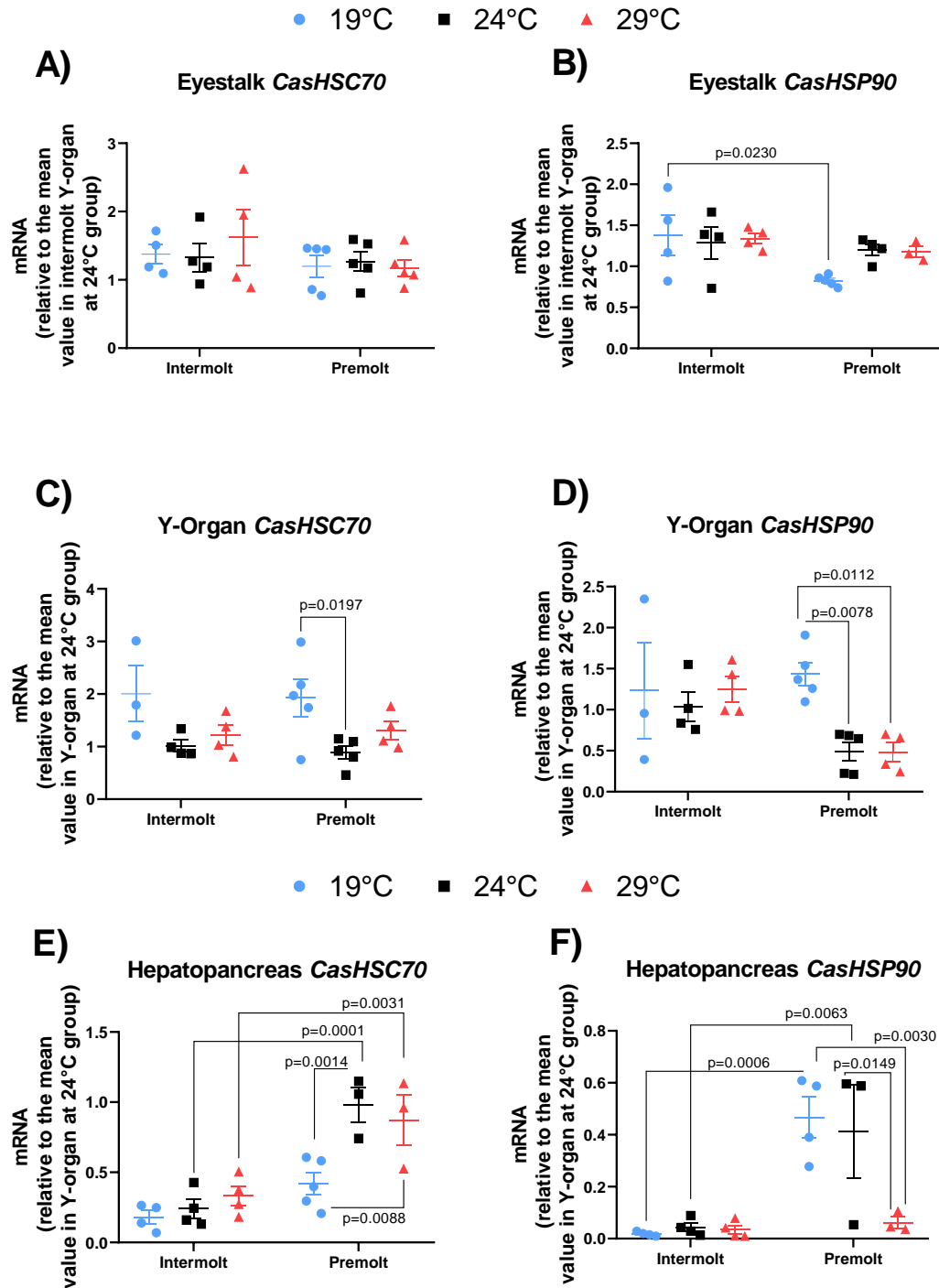


Figura 11. Expressão gênica relativa no pedúnculo óptico de *CasHSC70* (A) e *CasHSP90* (B), no órgão - Y de *CasHSC70* (C) e *CasHSP90* (D), e no hepatopâncreas de *CasHSC70* (E) e *CasHSP90* (F) de *C. sapidus* nos estágios de intermuda e pré-muda submetidos aos desafios térmicos de 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C. Os valores foram comparados por Two-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. $n=3-5$.

5.3.2. Receptor de ecdisteroides

A expressão gênica dos receptores de ecdisteroides foi avaliada no pedúnculo óptico e no hepatopâncreas dos animais em intermuda e pré-muda submetidos às diferentes temperaturas. O complexo neuroendócrino do pedúnculo sofreu influência do estágio de muda sobre a expressão dos *CasEcRs* [$F(1, 19) = 59,64, p < 0,0001$]. Animais em intermuda apresentaram uma maior expressão dos receptores em todas as temperaturas a que foram submetidos, quando comparados aos animais em pré-muda (Figura 12A).

O hepatopâncreas, por sua vez, revelou interação dos fatores, estágio de muda e temperatura, quando se analisou a expressão dos *CasEcRs* [$F(2, 16) = 62,13, p < 0,0001$]. Os animais em pré-muda, quando submetidos a 19°C, apresentaram níveis elevados de RNAm dos receptores de ecdisteroides em comparação aos animais em intermuda na mesma temperatura, como também, em relação aos espécimes de mesmo estágio submetidos a temperaturas mais altas (Figura 12B).

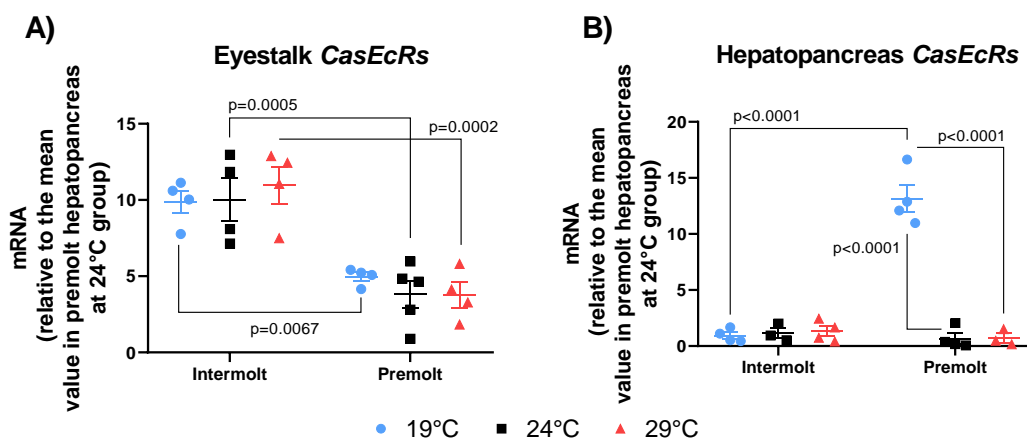


Figura 12. Expressão gênica relativa no pedúnculo óptico (A) e no hepatopâncreas (B) de *CasEcRs* de *C. sapidus* nos estágios de intermuda e pré-muda submetidos aos desafios térmicos de 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C. Os valores foram comparados por Two-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. $n=3-5$.

5.3.3. Genes relacionados à inibição da muda

A inibição do ciclo de muda e conseqüentemente da ecdise é mediada na maioria das espécies de crustáceos, incluindo o *C. sapidus*, principalmente pelo hormônio inibidor da muda, MIH, e seu receptor no órgão-Y, CG-YO1; além disso o hormônio hiperglicemiante de crustáceos, CHH, atua como hormônio acessório nesse processo. Diante disso, os genes relacionados aos hormônios e ao receptor do MIH foram avaliados nos grupos experimentais deste estudo.

De maneira geral, a expressão de *CasMIH* não é alterada mediante os estímulos por diferentes temperaturas em cada estágio, nem entre os estágios de muda aqui observados (Figura 13A). No entanto, a responsividade do órgão-Y ao MIH através do seu receptor *CasCG-YO1* é dependente da interação entre os fatores, estágio de muda e temperatura, considerados nessa pesquisa e confirmada por ANOVA [$F(2, 18) = 4,809$, $p=0,212$]. Os espécimes submetidos à temperatura de 19°C apresentaram uma elevada expressão do *CasCG-YO1* na intermuda em comparação com os animais de pré-muda nesta mesma condição térmica. Além disso, os indivíduos em pré-muda estimulados pela temperatura fria apresentaram níveis de expressão do receptor do MIH mais baixos em relação aos submetidos a 24°C no mesmo estágio (Figura 13B).

A expressão gênica do *CasCHH* no pedúnculo óptico foi responsiva à variação de temperatura nos animais em intermuda. Na temperatura de 29°C, os níveis de RNAm de *CasCHH* apresentaram-se elevados em relação às temperaturas mais baixas, 19 e 24°C. Ademais, quando os estágios foram comparados na mesma temperatura, os indivíduos de intermuda expressaram maiores níveis de *CasCHH* em comparação aos de pré-muda na temperatura de 29°C (Figura 13C).

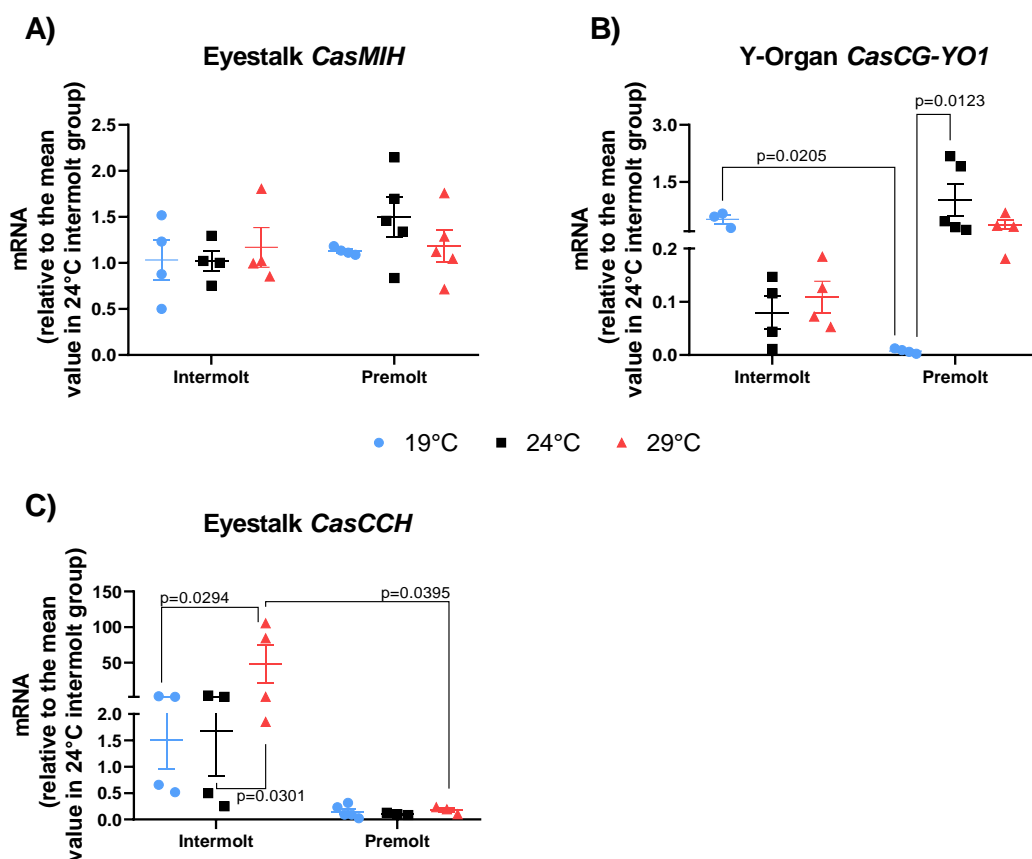


Figura 13. Expressão gênica relativa no pedúnculo óptico de CasMIH (A) e CasCCH (C) e no órgão-Y de CasCG-YO1 (B) em *C. sapidus* nos estágios de intermuda e pré-muda submetidos aos desafios térmicos de 19°C, 24°C (temperatura controle) e 29°C. Os valores foram comparados por Two-Way ANOVA, seguida de pós-teste de Bonferroni, com $p < 0,05$. $n=3-5$.

5.4. Proteogenômica

5.4.1. Caracterização do proteoma do pedúnculo óptico de *C. sapidus*

Esta metodologia foi estabelecida e os resultados foram obtidos graças à colaboração do pós-doutorando do grupo José Thalles Lacerda, bolsista FAPESP. Após a análise LFQ, 1.463 grupos de proteínas com pelo menos 2 peptídeos únicos foram identificados no proteoma total do pedúnculo óptico de *C. sapidus*, que inclui os estágios do ciclo de muda e temperaturas avaliadas neste estudo. Dada a identificação de peptídeos únicos, grupos de proteínas se referem a sequências proteicas não redundantes que incluem a identificação inequívoca de uma única proteína (grupos de proteínas únicas) e proteínas indiscerníveis que tiveram os mesmos peptídeos únicos convergindo sob sua

sequência (grupos de múltiplas proteínas) (Fancello e Burger, 2022). Nestes grupos de múltiplas proteínas, comumente encontrados contendo sequências de isoformas e proteínas com domínios conservados compartilhados, apenas uma sequência representativa do grupo é destacada como identificada. Tal abordagem evita redundância e, conseqüentemente, impede superestimar o número de proteínas identificadas.

Dentre estas proteínas detectadas, 1.367 foram identificadas a partir do banco de dados personalizado de *C. sapidus* (1ª rodada de análise) e 96 a partir do banco de dados da infra-ordem Brachyura (2ª rodada) na qual a proteína de cutícula calcificada CP19.0 isoforma b (CP19.0_b), proteína de cutícula artrodial AMP16.5 (AMP16.5) e o hormônio de inibição de muda (*Molt-inhibiting hormone*, MIH) foram identificadas.

Em seguida, nós avaliamos as proteínas majoritárias deste proteoma com base na área sob a curva (*Area under the curve*, AUC) calculada, que estima sua abundância relativa na amostra. O TOP10 das proteínas mais abundantes é representado por proteínas ligantes a actina (proteína diablo do tipo Kelch, beta actina e tropomiosina isoforma X1), ligantes de cálcio (proteína variante c ligante de cálcio sarcoplasmático, proteínas contendo domínio *EF-hand* e cadeia leve da miosina - alkali), proteína ligante de RNA (proteína 3 isoforma X3 ligante poli-RC), com atividade oxidoreductase (subunidade de hemocianina), ligante a ATP com atividade quinásica e que participa do processo de síntese de fosfocreatina (arginina quinase) (Figura 14A).

Para caracterizar a funcionalidade molecular do maquinário proteico do pedúnculo óptico, foi realizada a anotação de ontologia gênica (*Gene Ontology*, GO) (Figura 14B). A maioria das proteínas com anotação descrita desempenha funções moleculares (GO-MF) de ligação a metabólitos (ATP e GTP, fosfato e NAD) e hidrolases; ligação a metais (cálcio, zinco e magnésio), ligação a quitina, ligação a proteínas desnoveladas e ligação a RNA com atividade de fator de iniciação de transcrição;

componentes estruturais de ribossomo, citoesqueleto e cutícula; e proteólise (peptidases e inibidores).

Os processos biológicos detectados (GO-BP) através do proteoma estão relacionados à tradução, proteólise, fosforilação, transporte de proteínas (intracelular ou para o meio extracelular), processos metabólicos (carboidrato e ciclo do ácido tricarboxílico), enovelamento de proteínas, transdução de sinal, diferenciação celular, morfogêneses da estrutura anatômica e adesão celular. Majoritariamente, estas proteínas estão anotadas para estar presentes no componente celular (GO-CC) membrana, que inclui a membrana plasmática e de organelas, mas também há em ribossomos, microtúbulos e proteínas que são secretadas para fluidos ou transportadas para o meio extracelular pertencendo ao ambiente celular.

Dentre as proteínas com anotação para compartimentos celulares, 42 são descritas para serem secretadas pelo pedúnculo óptico e podem indicar possíveis marcadores de vias de sinalização endócrina exercida por este órgão sobre processos fisiológicos em outros tecidos. Destas, algumas se apresentam com atividade de ligação a cálcio (ex: calumenina-A), a quitina (ex: hemolectina e peritrofina 1), quitinases (ex: quitinase 1, possível quitinase 3), inibidores de proteases (ex: espondina 1, papilina e crustinas 3, 5, 6), lactoperoxidase (ex: peroxidase), proteínas que atuam na sinalização dopaminérgica e mantêm a conectividade cuticular e neuronal (ex: homólogo do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos, *MANF/CDNF-like protein*), fator de crescimento (ex: fator relacionado a PDGF/VEGF), ligação do peptídeo semelhante à insulina, e atividade de hormônios neuropeptídicos (ex: CHH e MIH).

Aqui, demonstramos a sequência proteica do CHH de *C. sapidus* identificada a partir de 6 peptídeos únicos bem como a identificação do MIH homólogo ao da espécie *Portunus trituberculatus* (Figura 14C). Neste contexto, é importante destacar as seguintes

observações: (1) algumas sequências proteicas do CHH de *C. sapidus* presentes na base de dados UniProtKB se encontram com um status de sequências não revisadas e, portanto, a convergência destes peptídeos sobre a sequência construída pelo transcriptoma na análise proteogenômica deve aperfeiçoar a anotação desta sequência proteica; (2) embora a sequência do MIH esteja anotada para *C. sapidus* no UniProtKB como revisada, a aplicação do algoritmo CD-HIT, com um *cut-off* de até 50% de identidade, eliminou esta sequência da base de dados Brachyura por ela ser menor (113 aminoácidos) e ter uma identidade de 93,4% com o MIH de *Portunus trituberculatus*; (3) embora outros hormônios peptídicos não tenham sido identificados, não podemos confirmar a ausência deles dado que suas quantidades podem estar abaixo do limite de detecção da técnica aplicada neste estudo.

Em seguida, foi realizada uma análise de agrupamento hierárquico para verificar as semelhanças entre os proteomas de cada grupo experimental de acordo com suas variabilidades. Tal abordagem resultou em uma separação de 2 grupos distintos, onde se encontram os proteomas de espécimes em pré-muda sob condições controle e de temperatura elevada (29°C) em um grupo e os demais proteomas em outro grupo (Figura 14D). Pôde-se observar que o estresse térmico pelo frio (19°C) sobre o estágio de pré-muda se traduziu em um perfil mais distinto do controle do que em 29°C; enquanto na intermuda, a resposta ao estresse pela temperatura mais alta se traduziu em um perfil mais distinto ao controle do que o frio. Ao avaliarmos os efeitos de forma integrada, notamos que o frio tem mais efeito sobre animais em pré-muda do que em intermuda. Nesta mesma linha, o estresse térmico de 29°C nos espécimes em pré-muda tem maiores distinções em relação ao seu controle, mesmo pertencendo a um mesmo grupo, do que o observado na intermuda. Isto pode ser notado ao subdividirmos o agrupamento em 3 grupos. Ou seja,

os proteomas das 2 temperaturas de estresses térmicos se mostraram mais distintas em relação ao controle nos indivíduos em estágio de pré-muda.

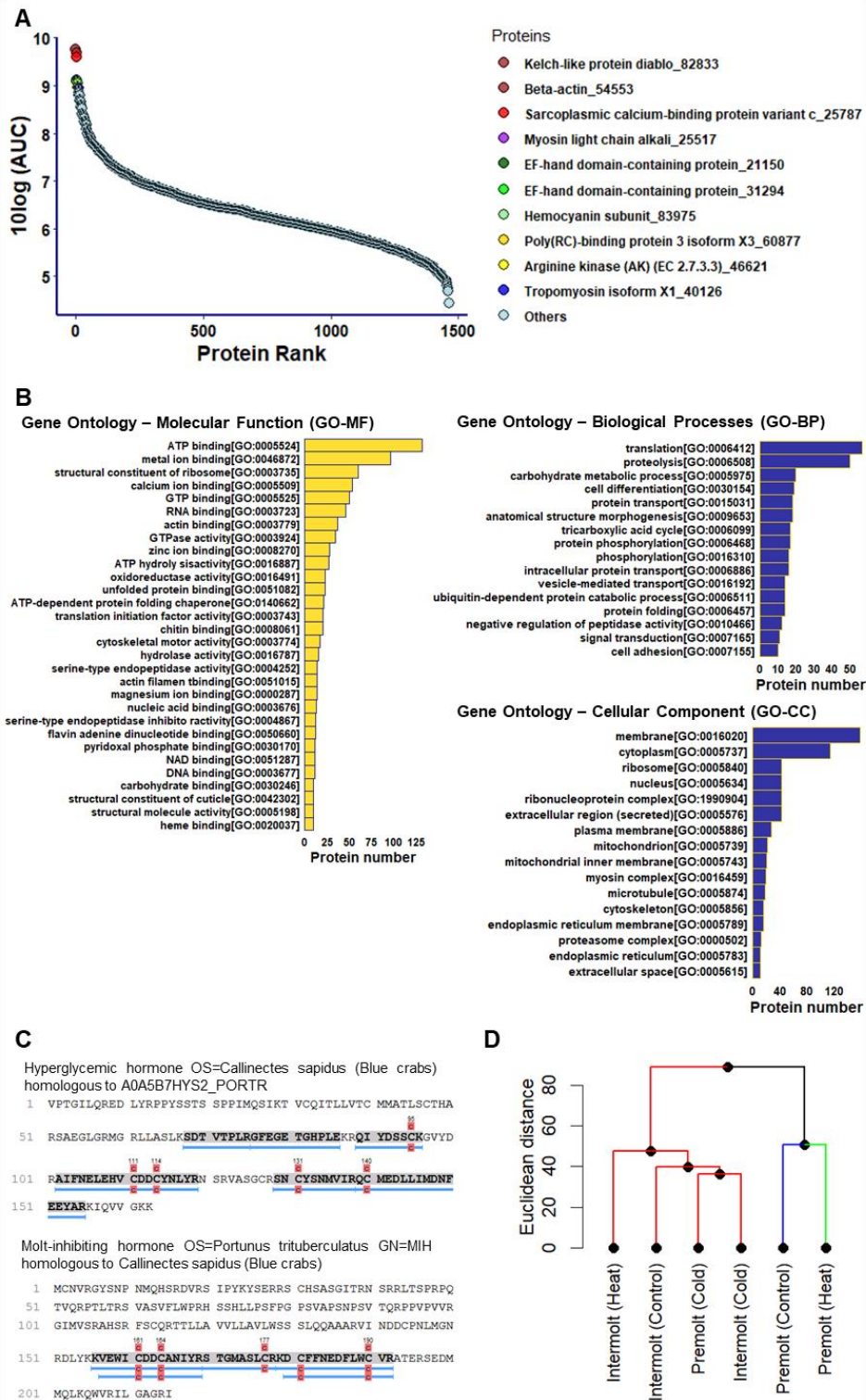


Figura 14. Identificação da funcionalidade do proteoma do pedúnculo óptico de *C. sapidus*. (A) Classificação das proteínas identificadas com base na sua AUC, destacando as TOP10 proteínas. A legenda do gráfico é ordenada pela abundância das proteínas descritas pelo seus nomes e pesos moleculares. (B) Anotação de GO para funções moleculares (GO-MF), processos biológicos (GO-BP) e componentes

celulares (GO-CC). (C) Sequências proteicas de CHH e MIH detectadas através de peptídeos únicos destacados em azul. (D) Dendograma do agrupamento hierárquico dos proteomas dos estágios do ciclo de muda e temperaturas. *Control* para temperatura de 24°C, *Cold* para 19°C e *Heat* para 29°C.

5.4.2. Diferenciação dos proteomas do pedúnculo óptico entre animais nos estágios de pré-muda e intermuda sob condições termoestáveis (24°C)

Na comparação entre os estágios de muda em condições termoestáveis (controle), 1.460 proteínas foram encontradas e quantificadas das quais 25 estão presentes exclusivamente nos indivíduos em estágio de pré-muda e 2 no estágio de intermuda. Ao avaliarmos estas proteínas, as 2 proteínas exclusivamente presentes no proteoma de espécimes em intermuda com pesos moleculares de 26.224 Da e 45.714 Da são descritas como não caracterizadas por serem homólogas às proteínas *uncharacterized protein* de *Portunus trituberculatus* (Uniprot ID: A0A5B7DAS7_PORTR) e *Scylla olivacea* (Uniprot ID: A0A0P4VYF4_SCYOL), respectivamente. Para inferir a funcionalidade destas proteínas, as sequências foram submetidas a análise de domínios conservados pelo HMMER (banco de dados PFAM). A proteína, cujo peso molecular é de 45.714 Da, apresenta domínio pertencente à família de proteínas ligantes a calcineurina, uma família de proteínas sarcoméricas que ligam a calcineurina ao aparato de contratilidade (PFAM ID: PF05556); enquanto a proteína de 26.224 Da não apresenta domínio identificado nas bases de dados.

Por outro lado, dentre as proteínas exclusivamente identificadas e mais abundantes no proteoma da pré-muda foram, a glutamina sintetase (GLNA_1), uma enzima que tem atividade de ligase para glutamato-amônia e conversão em glutamina, e em humano, está associada a processos de proliferação celular, regulação positiva da diferenciação epidérmica e resposta celular a fome; possível quitinase 3 (CHT3_3), uma proteína secretada que cataboliza quitina; proteína de cutícula artrodial AMP16.5, um componente estrutural da cutícula; inibidor de serina protease dipetalogastina (DPGN_2);

e a proteína de transporte tricarboxilato mitocondrial (SLC25A1). Esta última, em humanos participa da secreção de citrato da mitocôndria para o citosol em troca de malato, enquanto o citrato participa da gliconeogênese e síntese de ácidos graxos e esteroides (Figura 15A).

Em seguida, foi avaliada a quantificação relativa entre as 1.431 proteínas compartilhadas pelos 2 proteomas ($p\text{-value} < 0,05$; $\log_2\text{FC} > 1$ e $\log_2\text{FC} < -1$), cujas 321 proteínas estão aumentadas nos animais na pré-muda e 26 na intermuda. Dentre as proteínas quantificadas com diferenças significativas nos 2 proteomas, foram destacadas aquelas com maior diferença significativa, que apresentaram uma maior abundância na pré-muda em relação a intermuda (menor $p\text{-value}$ e/ou maior mudança de vezes) (Figura 15B). A proteína ligante de beta-glicano e a lipoproteína discoidal (DLP-BGBP, $p < 0,0001$ e $\log_2\text{FC} 7,22$), um transportador lipídico, foram as proteínas com a maior diferença entre os estágios; enquanto a glutamina sintetase (GLNA_2, $p < 0,0001$ e $\log_2\text{FC} 5,10$), com atividade similar a GLNA_1 exclusivamente identificada na pré-muda e destacada acima, apresentou a maior significância estatística, sendo mais abundante na pré-muda comparada a intermuda.

Por outro lado, a tetraspanina (TSPAN1, $p < 0,0001$ e $\log_2\text{FC} 6,71$) e a proteína com domínio de repetição WD contendo peso molecular de 35.504 Da (WD domain_35504) apresentaram significância estatística na intermuda comparada a pré-muda, embora a primeira tenha apresentado um aumento muito maior do que a segunda (WD domain_35504, $p < 0,0001$ e $\log_2\text{FC} 2,74$). Proteínas contendo repetições WD são conhecidas por servir como plataformas para a montagem de complexos proteicos ou mediadores de interação transitória entre outras proteínas (Jain e Pandey, 2018). Interessantemente, tetraspaninas são proteínas transmembrânicas com uma estrutura conservada que funcionam principalmente como organizadores de proteínas de

membrana e estão envolvidas em diversos processos de transdução de sinal (Terminie e Gillett, 2017). Além destas proteínas, foi identificada uma maior abundância da proteína de cutícula calcificada CP19.0 isoforma B (CP19.0_b, $p < 0,0001$ e \log_2FC 3,08), na intermuda em relação a pré-muda, o que sugere uma possível diferença estrutural da cutícula do pedúnculo óptico neste estágio.

A partir deste achado, foi observado que o proteoma dos animais em pré-muda apresentou aumento significativo da proteína de cutícula BD1 ($p < 0,05$ e \log_2FC 3,65) tal qual a identificação de forma exclusiva da proteína de cutícula artrodial AMP16.5. Nesta linha, o aumento da proteína obstructor-E (OBST-E, $p < 0,001$ e \log_2FC 6,07) na pré-muda proporciona uma ligação entre a modulação da estrutura da cutícula e o rearranjo da quitina neste estágio.

A proteína OBST-E é uma proteína de matriz extracelular ligante a quitina, mas que também pode ser secretada, descrita como participante do desenvolvimento de cutícula à base de quitina regulando o arranjo deste carboidrato necessário para a mudança de forma orientada da cutícula durante a metamorfose em *Drosophila melanogaster* (Tajiri et al., 2017). Este arranjo de quitina pode estar associado ao aumento de uma proteína contendo domínio glicosídeo hidrolase 18 (GH18) de 47.237 Da ($p < 0,05$ e \log_2FC 2,96) nos animais em pré-muda comparado a intermuda, à qual pertencem proteínas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos, ou entre um carboidrato e uma fração não carboidrato (IPR001223). Interessantemente, foram encontradas 20 proteínas ligantes a carboidratos e/ou associadas ao metabolismo de açúcares reduzidos na intermuda comparado à pré-muda nas quais se encontram vários tipos de lectinas como a ficolina-2, a calreticulina e lectinas do tipo C (Tabela 3).

Além da OBST-E, outras proteínas ligantes a quitina estão aumentadas na pré-muda comparado com a intermuda, como a quitina desacetilase (CDA) e peritrofina 1

(APER1_2); no entanto, estas proteínas são secretadas constitutivamente. Para esta categoria de proteínas, espera-se que a redução de sua quantidade no tecido seja dada a sua maior secreção para o fluido extracelular. Em congruência, Abbineni e colegas (2022) demonstraram que proteínas secretadas, de fato, tem maior abundância no meio condicionado de uma cultura celular do que em seu próprio lisado. Tal constatação pôde ser examinada na análise quantitativa do proteoma humano que apresenta discordâncias e concordâncias da relação entre os níveis de RNA e proteínas para esta categoria, em que a discordância poderia ser causada pela secreção constitutiva destas proteínas e a concordância pode sugerir que estas proteínas sejam armazenadas em vesículas secretoras e liberadas após estímulos (Jiang et al., 2020).

Desta forma, foram mapeadas 8 proteínas constitutivamente secretadas com diferenças significativas entre os proteomas de espécimes em pré-muda e intermuda. Nesta análise, as proteínas inseridas nesta categoria não estão descritas para serem encontradas em compartimentos celulares ou matriz extracelular. Além das proteínas CDA e APER1_2, também estão presentes os neurohormônios CHH e MIH, a proteína ligante do peptídeo do tipo insulina (IGFBP), inibidor inter-alfa-tripsina de cadeia pesada H3 (ITIH3), uma proteína contendo domínio globina de 20.979 Da e uma proteína contendo domínio SCP (*sperm-coating glycoprotein*, também chamado de domínio CAP) de 36.370 Da (Figura 15C).

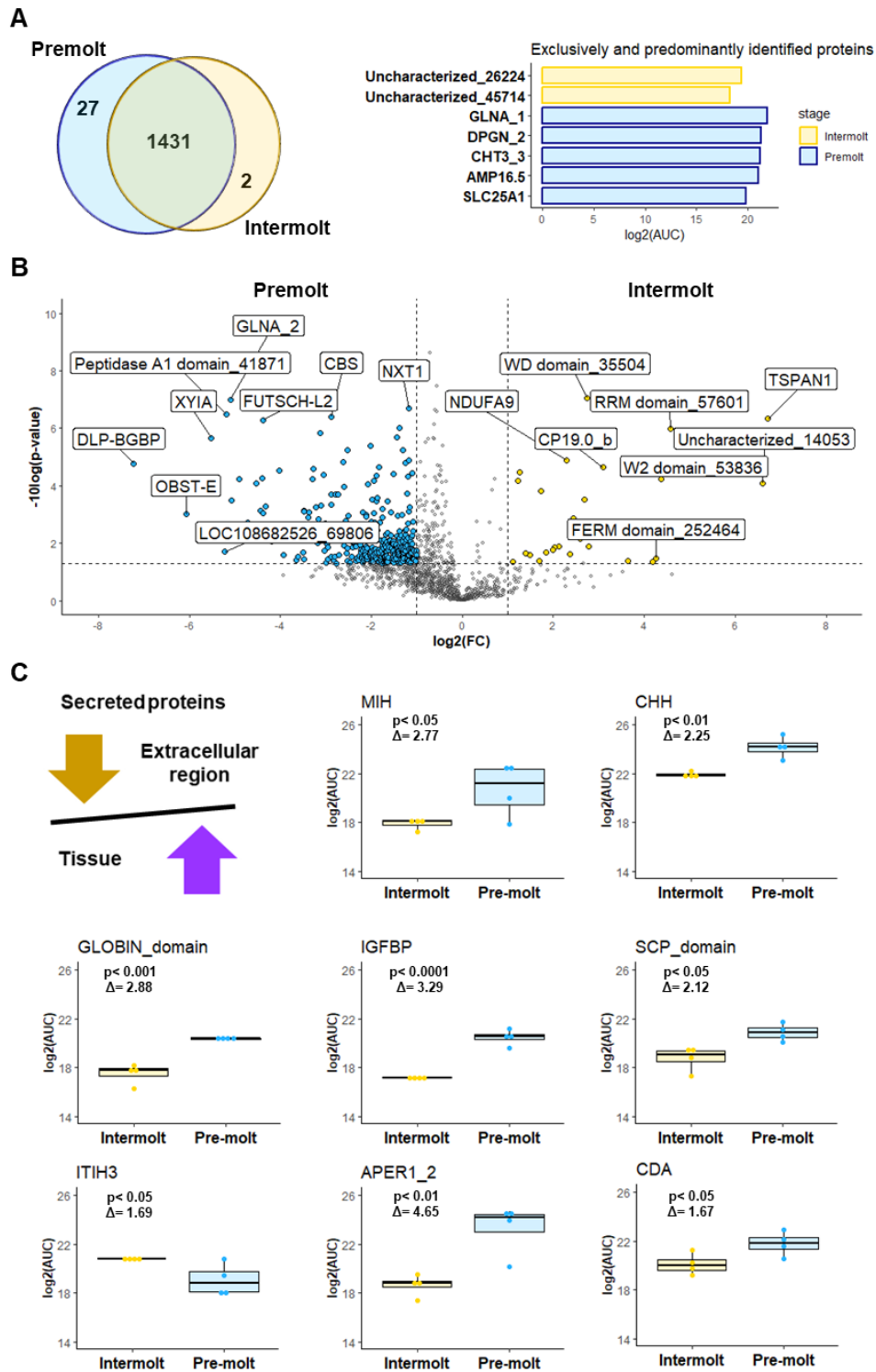


Figura 15. Comparação entre os proteomas do pedúnculo óptico de *C. sapidus* em pré-muda e intermuda a 24°C. (A) Diagrama de Venn das proteínas identificadas em cada proteoma e destaque para aquelas exclusivamente e predominantemente identificadas no respectivo grupo. (B) Gráfico Volcano plot referente a análise de quantificação relativa onde 347 proteínas tiveram diferenças significativas estimadas (p -value $< 0,05$; $\log_2FC > 1$ e $\log_2FC < -1$). Destaque em amarelo para 26 proteínas aumentadas nos animais em intermuda e em azul para 321 aumentadas nos em pré-muda. (C) Proteínas categorizadas como secretadas constitutivamente e que tiveram diferenças significativas entre os proteomas.

Tabela 3. Proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos ou ligantes de carboidratos diferencialmente codificadas nos proteomas de espécimes em intermuda e pré-muda a 24°C

Database	Protein name	Protein symbol	Avg. Mass (Da)	#Unique peptide	Condition related to intermolt
<i>C. sapidus</i>	*Alpha-amylase (EC 3.2.1.1)	AMYA	58.243	2	Decreased
Brachyura	*Putative chitinase 3	CHT3_3	194.439	4	Decreased
<i>C. sapidus</i>	*Mannose-binding lectin		25.644	6	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Obstructor-E	OBST-E	29.850	7	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Xylose isomerase	XYIA	50.941	9	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Peritrophin-1	APER1_2	26.738	7	Decreased
<i>C. sapidus</i>	C-type lectin domain-containing protein		27.365	2	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	65.099	4	Decreased
<i>C. sapidus</i>	GH18 domain-containing protein		47.237	3	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Hemolectin	HML	27.871	8	Decreased
<i>C. sapidus</i>	GDP-L-fucose synthase	GFUS	36.530	4	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Alpha-L-fucosidase	FUCA	54.373	11	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Trehalose 6-phosphate synthase 1 isoform 1	TPS1	103.194	27	Decreased
<i>C. sapidus</i>	P-type domain-containing protein		115.514	5	Decreased
<i>C. sapidus</i>	C-type lectin lectoxin-Phi1	LECM1	13.448	7	Decreased
<i>C. sapidus</i>	C-type lectin 1	CLEC1	25.368	8	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Phosphohexomutase (Phosphomannose isomerase)	MPI-L	45.440	9	Decreased
<i>C. sapidus</i>	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	52.738	17	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Chitin deacetylase	CDA	70.327	13	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Calreticulin	CALR	50.779	16	Decreased
<i>C. sapidus</i>	Ficolin-2	FCN2_0	34.638	2	Decreased
<i>C. sapidus</i>	C-type lectin 2	CLEC2	30.311	5	Decreased

* Identificadas exclusivamente na pré-muda.

5.4.3. Modulação dos proteomas do pedúnculo óptico em estágios de pré-muda e intermuda em resposta aos estresses térmicos (19°C e 29°C)

Para identificar as alterações nos maquinários proteicos de cada estágio mediante estresses térmicos de exposições a temperaturas baixa (19°C) e alta (29°C) a partir de sua condição controle (24°C), as 3 condições de temperatura foram comparadas entre si para cada estágio, uma vez que foi observada larga diferença quantitativa entre os proteomas das condições controle de intermuda e pré-muda. Dos 1.463 grupos de proteínas identificados no proteoma total do pedúnculo óptico, 1 proteína foi encontrada exclusivamente na intermuda e 7 na pré-muda. Na comparação entre identificações de proteínas nas 3 condições de temperatura, foi observado que 24 proteínas estavam ausentes pela exposição ao frio e 11 proteínas foram identificadas após os estresses térmicos de baixa e alta temperatura na intermuda. Já nos indivíduos em pré-muda 43 proteínas estavam ausentes pela exposição ao frio (Figura 16A). As proteínas ausentes referem-se àquelas em que não houve identificação de qualquer peptídeo único o que, portanto, pode ser atribuído a sua baixa abundância no respectivo proteoma comparado aos demais.

Após a análise de quantificação relativa para identificar as proteínas com abundâncias relativas significativamente diferentes ($p\text{-value} < 0,05$; $\log_2\text{FC} > 1$ e $\log_2\text{FC} < -1$), um total de 185 proteínas das 1.456 da intermuda foram alteradas pelos estresses térmicos em relação ao respectivo controle, cujo frio levou à redução de 75 proteínas e aumento de 35 proteínas, enquanto a temperatura de 29°C reduziu 34 proteínas e aumentou 74 proteínas. Por outro lado, das 1.462 proteínas do proteoma da pré-muda, 558 proteínas foram alteradas pelos estresses térmicos em relação ao controle, onde 492 proteínas foram diminuídas e 24 aumentadas na exposição ao frio e 72 proteínas diminuídas e 30 aumentadas na exposição a 29°C (Figura 16B). Supreendentemente, das 321 proteínas

aumentadas na pré-muda em comparação com a intermuda verificadas na condição de termoestabilidade, 206 foram reduzidas após a exposição ao frio na pré-muda.

Algumas das proteínas quantificadas com diferenças significativas em relação ao controle podem ser alteradas de forma distinta de acordo com o tipo de estresse térmico (Figura 16C). Por exemplo, na intermuda as proteínas beta-centratina (ACTR1B), fator relacionado a PDGF/VEGF (PVF), inibidor de proteases de quatro domínios (MCP1_4) e proteína contendo domínio de lectina-símile do tipo L foram reduzidas na exposição ao frio e aumentadas na exposição a temperatura mais alta; enquanto a proteína 7 contendo domínio em p24 transmembrânica (TMED) e uma I-conectina de 115.320 Da (I-CON) apresentaram uma alteração oposta. Na pré-muda, a crustacianina-C1 (CRC1) e a proteína de cutícula calcificada CP19.0 isoforma b (CP19.0_b) foram algumas das proteínas reduzidas na exposição ao frio e aumentadas a 29°C. A CRC1 que se liga ao carotenoide astaxantina que traduz a variedade de cores externas em crustáceos (Wade et al, 2009) e a CP19.0_b que é uma proteína relacionada a calcificação; ambas foram alteradas na comparação de intermuda e pré-muda em temperatura controle.

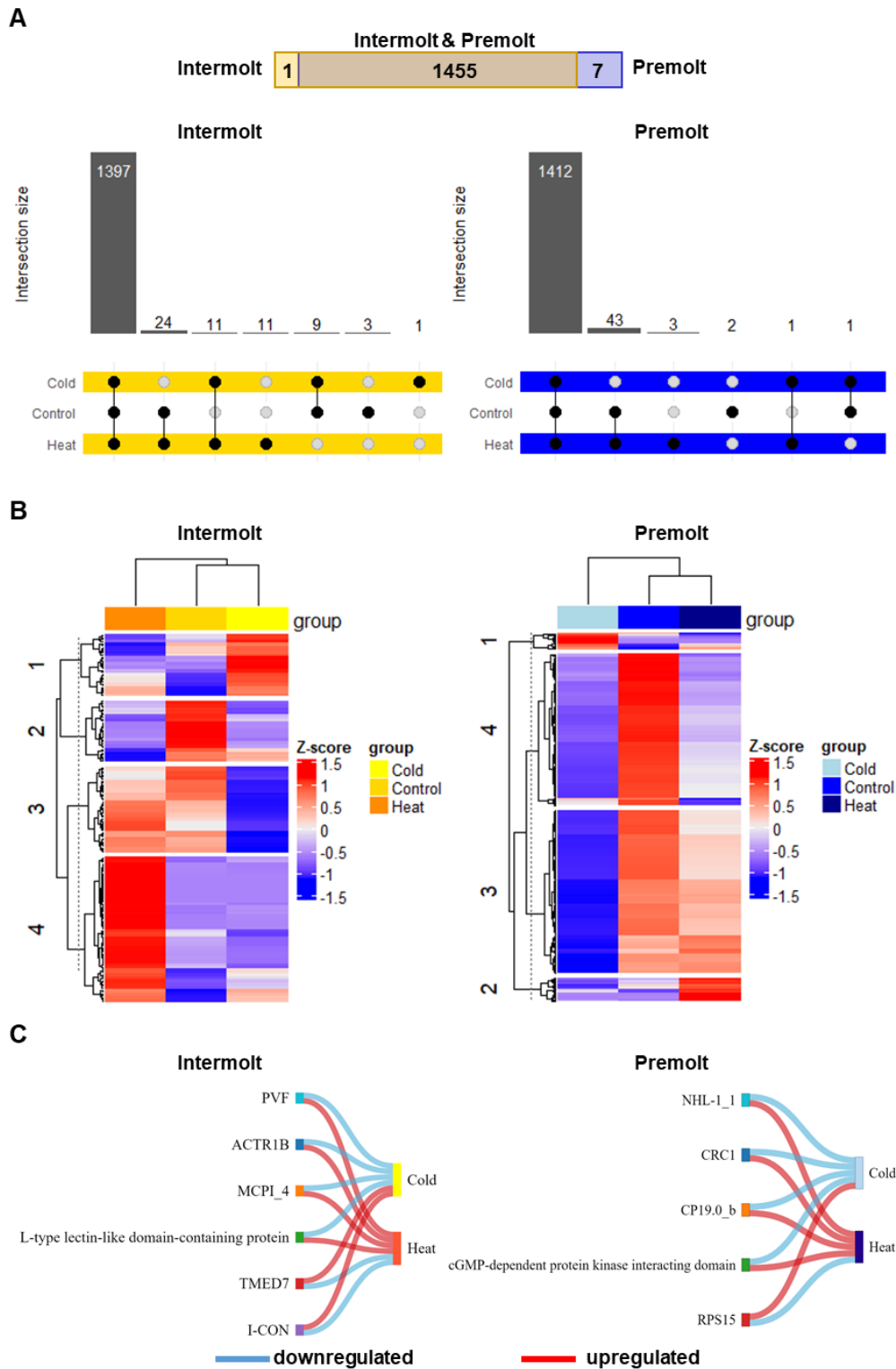


Figura 16. Comparação dos proteomas de indivíduos em intermuda e pré-muda na exposição aos estresses térmicos de 19 e 29°C. (A) Distribuição das proteínas identificadas em cada proteoma de acordo com o estágio de muda. (B) Mapa de calor das proteínas com diferenças significativas em sua abundância relativa na comparação entre os estresses térmicos e a temperatura controle em cada estágio (ANOVA one-way, $p < 0,05$; $\log_2FC > 1$ e $\log_2FC < -1$). (C) Proteínas alteradas diferentemente de acordo com o tipo de estresse térmico submetido.

Dada que a proteína CP19.0_b foi considerada um marcador da possível modificação da estrutura da cutícula entre os estágios de intermuda e pré-muda na temperatura controle, sua alteração também foi observada no estágio de intermuda com redução apenas no grupo submetido a 29°C. Para aprofundar o conhecimento sobre a relação de abundância desta proteína e as demais que podem conferir uma modificação da cutícula, foram avaliadas proteínas alteradas apenas pela exposição a temperatura mais alta intermuda (Figura 17). Destas, as proteínas lectina 1 do tipo C (CLEC1), OBST-E e APER1_2 não foram identificadas no proteoma da intermuda nesta condição térmica. Por outro lado, as proteínas acil-CoA desidrogenase específica de cadeia curta mitocondrial (ACADS), sarcosine desidrogenase mitocondrial (SARDH), aminopeptidase Ey (ANPEP_4) e a proteína de cutícula artrodial AMP16.5 passaram a ser identificadas. Além destas, algumas lectinas, como a lectina 2 do tipo C (CLEC2) e ficolin-2 (FCN2_0), e a proteína contendo domínio de peptidase A1 foram aumentadas.

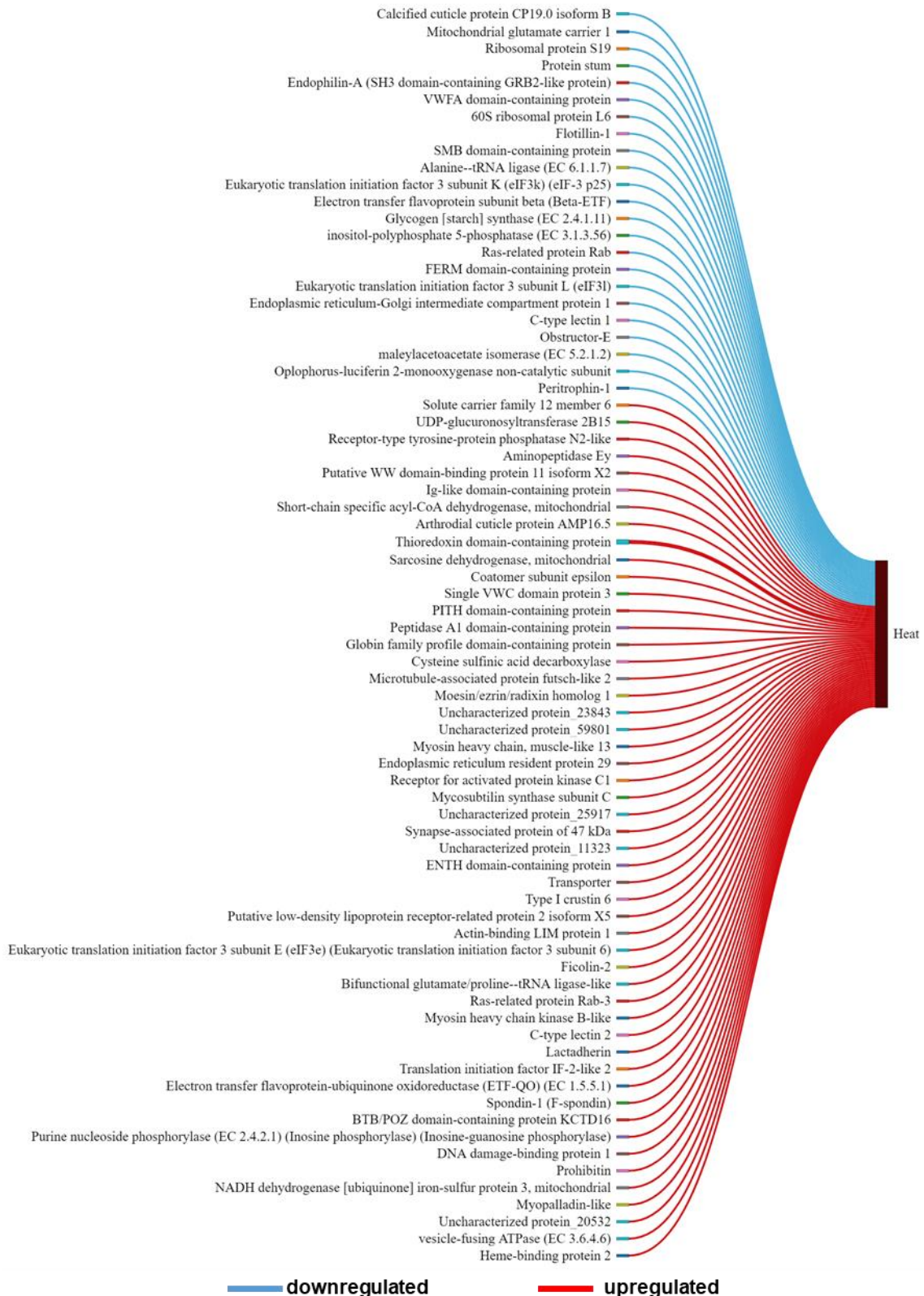
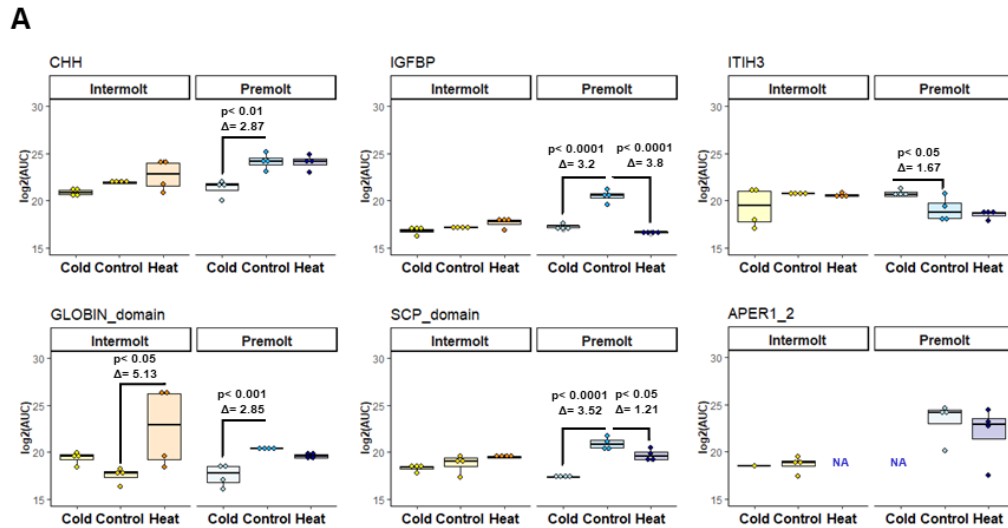


Figura 17. Gráfico *Sankey plot* das proteínas diferencialmente quantificadas no proteoma de indivíduos em intermuda para correlação com a proteína CP19.0_b. Todas as proteínas apresentaram diferenças significativas mediante a exposição a 29°C sem alteração na exposição ao frio.

Em seguida, as proteínas constitutivamente secretadas que apresentaram diferenças significativas entre intermuda e pré-muda na temperatura controle foram avaliadas mediante exposição aos estresses térmicos em cada estágio. Destas, o MIH e o CDA não apresentaram variações significativas. Na pré-muda, a proteína contendo domínio globina, CHH, APER1_2 foram reduzidas apenas na exposição ao frio; IGFPB e proteínas contendo domínio SCP foram reduzidas em ambos os estresses térmicos; ITIH3 aumentou apenas exposição ao frio. Pelo prisma da intermuda, a proteína contendo domínio globina aumentou e APER1_2 diminuiu no grupo submetido a 29°C (Figura 18A).

Dada a importância de chaperonas, como as proteínas de choque térmico (*Heat shock protein*, HSP), para modular uma variedade de respostas imunes e inflamação em crustáceos, HSPs e outras proteínas associadas ao enovelamento proteico foram avaliadas. Majoritariamente, esta classe de proteínas teve redução significativa na pré-muda após exposição ao frio. Na intermuda, a proteína de choque térmico 83 (HSP90) também teve redução na exposição ao frio, enquanto a subunidade 2 da proteína *prefolding* teve aumento em ambas as condições de estresse térmico (Figura 18B).



B

Database	Protein name	Protein symbol	Avg. Mass (Da)	#Unique peptide	Intermolt		Premolt	
					Cold	Heat	Cold	Heat
<i>C. sapidus</i>	70kD heat shock protein		20048	10	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Calreticulin	CALR	50779	16	↔	↔	↓	↔
Brachyura	Calreticulin	CALR	48594	2	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	HSC70-3	72687	10	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Heat shock cognate 70-like protein		18180	2	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Heat shock protein 22	HSP22_1	115849	6	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Heat shock protein 60		59083	23	↔	↔	↓	↔
Brachyura	Heat shock protein 83	HSP90AA1	87389	4	↓	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Heat shock protein 83	HSP90-2	82982	32	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Hsc70-interacting protein	ST13	53929	7	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase)	CYP6	22499	7	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase)	CYP1	25960	4	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Prefoldin subunit 1		17850	7	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Prefoldin subunit 2	PFDN2	19259	6	↑	↑	↔	↔
<i>C. sapidus</i>	Prefoldin subunit 3	VBP1_1	23234	6	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Prefoldin subunit 4	PFDN4	16578	4	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Prefoldin subunit 5		18865	4	↔	↔	↔	↓
<i>C. sapidus</i>	T-complex protein 1 subunit delta		59276	14	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	T-complex protein 1 subunit gamma		61772	21	↔	↔	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Uncharacterized protein		20532	3	↔	↑	↓	↔
<i>C. sapidus</i>	Uncharacterized protein		93399	19	↔	↔	↓	↔

Figura 18. (A) Proteínas secretadas constitutivamente com diferenças significativas entre indivíduos em intermuda e pré-muda na condição controle também são alteradas pela exposição aos estresses térmicos. (B) Mapeamento de proteínas relacionadas ao enovelamento proteico que apresentaram diferenças significativas pela exposição aos estresses térmicos.

6. DISCUSSÃO

O efeito da temperatura sobre o pedúnculo óptico, o órgão-Y e o hepatopâncreas - componentes do sistema neuroendócrino relacionado com o ciclo de muda de crustáceos - foi investigado em espécimes de *Callinectes sapidus* em intermuda e pré-muda. O estudo foi conduzido com o objetivo de compreender as respostas fisiológicas dos animais diante de distintos estímulos térmicos, tendo como alvos a morfologia do hepatopâncreas, os níveis hemolinfáticos de ecdisteroides e metabólitos, a expressão gênica e a análise proteogenômica comparativa.

O hepatopâncreas é um órgão complexo, multifuncional e compõe a maior parte do trato digestivo dos crustáceos. A regulação do metabolismo energético, síntese de enzimas digestivas, proteínas e lipídeos, secreção de hormônios, armazenamento de nutrientes e desintoxicação do organismo são os principais papéis funcionais atrelados a este órgão, garantindo assim a homeostase do organismo. Ressalta-se ainda a relevância deste órgão na regulação do ciclo de muda, uma vez que a maioria destas funções está intimamente ligada ao processo de crescimento em crustáceos. Neste contexto, o hepatopâncreas torna-se um importante objeto de estudo para a observação de respostas a diferentes condições ambientais e fisiológicas.

É válido salientar que as diversas funções mediadas pelo hepatopâncreas estão diretamente relacionadas à diversidade de sua composição celular, uma vez que cada tipo de célula desempenha uma função específica (Röszer, 2014; Vogt, 2019). Os tipos celulares hepatopancreáticos podem ser facilmente distinguidos através de análise histológica que, no presente estudo, foi utilizada para avaliar a morfologia do hepatopâncreas de animais em intermuda e pré-muda submetidos a três diferentes temperaturas. É nítido nas imagens apresentadas neste trabalho que, para ambos os estágios, a temperatura parece alterar a composição celular. No entanto, limitações

encontradas durante o desenvolvimento dos experimentos, como o baixo número de animais utilizados (n=1), nos impediram de descrever melhor o efeito da temperatura sobre a abundância dos tipos celulares e realizar a comparação quantitativa desses resultados. De todo modo, observações sobre os achados abrirão caminhos para uma investigação mais profunda do efeito da temperatura sobre o hepatopâncreas de *C. sapidus*.

Como esperado, dentro da condição térmica controle, o hepatopâncreas do indivíduo em intermuda aparenta ter uma diferença morfológica em relação ao espécime em pré-muda, estágios confirmados pela concentração final de ecdisteroides circulantes. Alterações na composição celular do hepatopâncreas vêm sendo sugeridas como consequência de adaptações nas respostas hepatopancreáticas para atender às demandas fisiológicas do organismo. São exemplos dignos de nota as mudanças durante o desenvolvimento ovariano da espécie *Scylla olivacea* (Aaqillah-Amr et al., 2018), nos componentes metabólicos, como lipídeos totais, no hepatopâncreas ao longo do ciclo de muda na espécie *Eriocheir sinensis* (Tian et al., 2012), e em respostas gênicas de *Eriocheir sinensis* relacionadas a diferentes estágios de muda (Huang et al., 2015). O papel das células R na pré-muda foi relatado por Becker e colaboradores (1974) como reserva de grânulos de fosfato de cálcio necessários para a calcificação do exoesqueleto após a ecdise.

Entre as temperaturas, os indivíduos em intermuda parecem apresentar modificações sutis na morfologia dos túbulos do hepatopâncreas, enquanto na pré-muda essas alterações se mostram mais acentuadas. Um dos poucos estudos encontrados na literatura sobre o efeito da temperatura na morfologia hepatopancreática demonstrou que tanto o lúmen dos túbulos quanto o número de células B reduziram, enquanto as células R aumentaram de acordo com a diminuição da temperatura (Yang et al., 2023). Com base

nisso, propomos que a temperatura também pode ser um fator que leva a alterações nas funções mediadas pelo hepatopâncreas e, conseqüentemente, a mudança nos tipos celulares envolvidos. Estes resultados nos estimulam a confirmar essa hipótese por meio de investigações adicionais futuras.

Para uma melhor compreensão das possíveis alterações entre os estágios do ciclo de muda e mediadas pela temperatura sobre o pedúnculo óptico de *Callinectes sapidus*, nosso estudo se fez pioneiro na proteogenômica e caracterização do proteoma e da análise comparativa do pedúnculo ocular, um dos órgãos-chave no processo de muda, de *C. sapidus*. A proteogenômica visa a identificar proteínas variantes ou desconhecidas em repositórios públicos, usando bancos de dados de proteínas personalizadas derivadas do transcriptoma (ou do genoma) onde a informação do transcriptoma pode não somente reduzir a ambigüidade das identificações de proteínas, mas também a identificação de falso-positivos (Fancello and Burger, 2022). Desta forma, o uso da proteogenômica para organismos não modelos, como *C. sapidus*, é uma ferramenta valiosa para o entendimento das respostas fisiológicas observadas. Para ratificar a correlação entre a mudança do complexo proteico de acordo com o estágio de muda, foram investigadas, a princípio, as diferenças de assinatura molecular entre ambas as fases em condição controle (24°C) onde observamos que as principais diferenças estavam relacionadas à composição cuticular e a processos metabólicos. De fato, o pedúnculo ocular do crustáceo é coberto pela cutícula extracelular, um importante órgão efetor alvo a jusante ideal para estudar alterações moleculares no ciclo de muda (Lv et al., 2017).

As proteínas majoritárias presentes no estágio de pré-muda em comparação a intermuda estão associadas a homeostase energética celular, enquanto na intermuda foi notado um processo de alteração estrutural da cutícula voltado para calcificação e menor gasto energético com base na abundância relativa de suas proteínas. Esses achados são

similares ao apresentado por Kuballa e colaboradores (2011) em estudo de transcriptoma do pedúnculo ocular de *Portunus pelagicus*, onde demonstraram que proteínas necessárias para o metabolismo energético têm o pico de expressão no início da pré-muda, enquanto proteínas de cutícula têm regulação positiva na intermuda quando comparada à pré-muda precoce, incluindo para cutícula calcificada. Nesta linha, foram identificados na pré-muda do pedúnculo óptico de *C. sapidus* uma possível quitinase 3 (CHT3_3), proteína de cutícula artrodial AMP16.5, aumento da proteína de cutícula BD1 e obstructor-E para modulação da estrutura da cutícula e o rearranjo da quitina, enquanto na intermuda um dos principais marcadores foi a proteína de cutícula calcificada CP19.0 isoforma B.

A partir das propriedades mecânicas das cutículas, pode-se sugerir que algumas das proteínas devem ser capazes de cumprir certas funções, como aderir fortemente ao sistema filamentososo da quitina, em que quase todas as proteínas nas cutículas flexíveis estarão diretamente envolvidas na ligação da quitina e o espaço entre os filamentos de quitina serão ocupados por proteínas ligadas à quitina e água (Andersen, 1999). Neste contexto, é esperado que cutículas flexíveis estejam presentes na fase de pré-muda pelo rearranjo de quitina e água, como demonstrado pela assinatura proteica. De fato, crustáceos absorvem água do ambiente para os tecidos do seu corpo durante a pré-muda tardia, ecdise e na pós-muda inicial para a expansão da nova cutícula via Na^+/K^+ -ATPase, onde a osmolalidade da hemolinfa é maior na pré-muda em comparação a intermuda uma vez que há um aumento da concentração de sódio na hemolinfa gerando um influxo de água na pré-muda (Foguesatto et al., 2019).

Outra característica molecular associada à mudança da cutícula do estágio de intermuda para pré-muda está o aumento da codificação de proteínas ligantes de carboidratos como as lectinas do tipo C (Tabela 3). Receptores da lectina tipo C

apresentam padrão de expressão com níveis relativamente baixos na intermuda e depois um aumento nos estágios de pré-muda, como demonstrado em estudo prévio (Kuballa et al., 2011).

Considerando que o presente estudo avalia a muda de crustáceos através das possíveis diferenças entre os estágios antagônicos do ciclo em relação ao efeito de diferentes temperaturas, foram avaliados os ecdisteroides, hormônios-chave neste processo. Na literatura, está bem estabelecido que os níveis circulantes de ecdisteroides ao longo do ciclo de muda indicam quando a ecdise irá ocorrer (Quackenbush, 1986; Chang, 1995; Chang e Mykles, 2011) e que, para algumas espécies, foram discriminadas concentrações de referência em cada estágio ou subestágio do ciclo de muda (Skinner, 1962; Spindler e Anger, 1986; Yu et al., 2002; Chung, 2010). Os resultados do presente trabalho indicaram que as temperaturas abaixo e acima da condição controle exerceram efeitos opostos sobre as concentrações desse hormônio entre os estágios de muda, embora significativa apenas a redução da concentração a 19°C nos animais de pré-muda. Na condição controle para ambos os estágios, os níveis seguiram o esperado, uma redução dos níveis circulantes de ecdisteroides na intermuda e um aumento na pré-muda.

Reforçando a relação intrínseca dos níveis de ecdisteroides com a ecdise, nossos dados corroboram os achados da literatura de que temperaturas frias ocasionam o aumento no intervalo entre ecdises, portanto diminuem a frequência de muda, características macroscópicas do ciclo, e que em temperaturas altas ocorre o contrário (Stoner et al., 2013; Cunningham e Darnell, 2015). No entanto, os mecanismos moleculares e fisiológicos responsáveis por estes fenótipos estão sendo só recentemente estudados. Um estudo feito com caranguejos juvenis *Metacarcinus magister* demonstrou uma correlação entre temperatura e estágio de muda na expressão gênica de *Rheb* (*Ras homolog enriched in brain*) no órgão-Y, onde seus transcritos diminuía de acordo com

o aumento da temperatura. Por outro lado, a expressão do *mTOR* (*mechanistic target of rapamycin*), que atua no estado ativado do órgão-Y estimulando a síntese de ecdisteróides, e que é ativado pelo Rheb, não sofreu influência da temperatura em sua expressão. Os autores concluíram que a expressão de *Rheb* pode ser usada para avaliar os efeitos da muda e da temperatura na atividade de mTOR nos tecidos de crustáceos (Wittman et al., 2018). A expressão dos genes codificadores de mTOR e das enzimas que participam da síntese ecdisteroidogênica foi regulada positivamente na temperatura mais alta testada no órgão-Y do caranguejo *Paralithodes camtschaticus* (Andersen et al., 2022).

Um dos efeitos claros do frio sobre os animais em pré-muda foi a redução dos níveis hemolinfáticos de ecdisteróides gerando um fenótipo de intermuda para esse parâmetro. Tal constatação pôde ser corroborada pela análise de agrupamento entre os proteomas dos estágios de intermuda e pré-muda sob as 3 temperaturas baseada na abundância relativa das proteínas identificadas em cada proteoma. Foi observada uma maior correlação entre proteomas da pré-muda sob condição controle e estímulo de alta temperatura, onde os níveis de ecdisteróides circulantes são de aproximadamente 143,2 ng/mL e 123,2 ng/mL, respectivamente; enquanto os demais grupos experimentais estão mais correlacionados entre si assim como seus níveis de ecdisteróides estão mais próximos (Tabela 2; Figura 14D). De maneira geral, os estudos moleculares e fisiológicos sobre os fenômenos causados pela temperatura no ciclo de muda estão se intensificando e demonstram que a síntese de ecdisteróides é um dos pontos afetados pelo estímulo térmico, bem como o conteúdo proteico do pedúnculo ocular. Estes avanços têm contribuído significativamente para o entendimento do efeito da temperatura sobre o ciclo de muda de crustáceos. Nossos resultados somam-se a esses estudos e fortalecem essa compreensão.

A concentração dos ecdisteroides na hemolinfa é reflexo de sua síntese que, dentre outros fatores, é dependente da disponibilidade da sua molécula precursora, o colesterol (Sheen et al., 1994; Mykles, 2011). Um estudo com a espécie *Portunus trituberculatus* demonstrou que a concentração de ecdisona aumentava de acordo com o aumento da concentração do colesterol na dieta (0,12% a 1%); no entanto, concentrações de colesterol acima de 1% reduziam os níveis do hormônio da muda (Zhu et al., 2022). Nossos resultados demonstraram que os níveis hemolinfáticos de colesterol em *C. sapidus* estão mais altos na pré-muda do que na intermuda, exceto na temperatura mais baixa. Este resultado corrobora estudos anteriores realizados com essa espécie, quando na condição controle (Legrand et al., 2021). Estes mesmos autores sugerem ainda que, no início da pré-muda, um aumento nos níveis de ecdisteroides na hemolinfa estimula a apolipoproteína *D-like* (transportadora de colesterol) a captar mais colesterol para a síntese de ecdisteroides no órgão-Y para os próximos sub-estágios. Em nosso estudo, na pré-muda, os extremos térmicos avaliados aqui, promoveram aumento do colesterol na temperatura mais alta e redução na temperatura mais baixa, quando comparados entre si.

Em mamíferos, o colesterol aumenta o metabolismo lipídico e a atividade de enzimas lipogênicas, bem como reduz a β -oxidação culminando no acúmulo de triglicérides (Fungwe et al., 1993). Em *C. sapidus*, ao passo que o colesterol apresentou diferenças entre os estágios nas condições de 24 e 29°C, os níveis de triglicérides, por sua vez, estavam aumentados apenas na condição térmica de 29°C, na pré-muda em relação a intermuda, concomitante com a maior concentração de colesterol na pré-muda. Este resultado vai de encontro a um estudo realizado em juvenis do caranguejo *Paralithodes platypus*, onde se observou que o aumento nos lipídeos totais foi dependente de aumento na temperatura (Stoner et al., 2013). Porém um estudo com a espécie *Portunus trituberculatus* demonstrou que, quando o colesterol dietético foi aumentado, nenhuma

mudança foi vista nos níveis de triglicérides (Zhu et al., 2022). A literatura e os resultados aqui apresentados indicam que a temperatura, dieta e o ciclo de muda interferem significativamente nos níveis de colesterol e triglicérides em crustáceos, e mais estudos são necessários para entender como esses fatores afetam a síntese de ecdisteroides nesses animais.

O estímulo térmico é um dos principais fatores que desencadeia a produção de proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs são reconhecidas como chaperonas produzidas em todos os organismos em respostas ao estresse e sua ativação não é restrita apenas por choque térmico (Selvakumar e Geraldine, 2005; Gbotsyo et al., 2020). Vários outros estressores podem levar ao aumento destas proteínas, tais como, anóxia, hipóxia, degradação proteica, dano microbiano, isquemia, toxinas e acidose (Frenkel et al., 2008; Roberts et al., 2010; Chiasson e Taylor, 2017; Junprung et al., 2021). No presente trabalho, avaliamos a expressão de genes codificadores das proteínas HSP90 e HSC70, nos órgãos-alvos selecionados em siris em intermuda e pré-muda submetidos a 3 condições de temperatura. Proteínas de choque térmico estão relacionadas a processos fisiológicos como muda e desenvolvimento ovariano e embrionário em crustáceos (Spees et al., 2003; Cesar e Yang, 2007; Liang et al., 2020). Além disso, desempenham inúmeras funções moleculares, incluindo o reparo e enovelamento de proteínas e, portanto, podem atuar na seleção e direcionamento de proteínas anormais para degradação em proteassoma ou lisossomas (Mengal et al., 2023).

Pode-se considerar que a expressão gênica das HSPs no pedúnculo óptico é constitutiva, onde alterações entre as temperaturas em um mesmo estágio não foram observadas. Já o proteoma evidenciou diferenças entre as temperaturas, no que diz respeito às HSPs e outras proteínas envolvidas no enovelamento proteico, no pedúnculo óptico dos animais. Curiosamente, foi observado que as proteínas de enovelamento

proteico como HSPs são significativamente reduzidas no estágio de pré-muda após o estímulo por frio. A expressão reduzida de HSPs pode ser atribuída à depressão do metabolismo energético à temperatura fria, como demonstrado em estudo desenvolvido com *Portunus trituberculatus*, os quais pararam de se alimentar e não tiveram ingestão de energia quando submetido a temperaturas baixas. Desta forma a incompatibilidade entre o aumento da demanda energética e o esgotamento metabólico foi associada à redução da expressão de HSPs no hepatopâncreas (Meng et al., 2014).

Em contrapartida, nossos resultados demonstraram que o hepatopâncreas apresentou uma maior variação da expressão gênica de ambas as proteínas, dependente da temperatura e do estágio de muda, sendo mais expressas na pré-muda. Estudos com outras espécies de crustáceos também refletem diferentes respostas entre os órgãos quando os animais são expostos a diferentes temperaturas. A expressão de HSC70 e HSP90 foi aumentada no músculo abdominal de *Homarus americanus* 1 e 2 horas respectivamente após um estresse térmico (Chang, 2005). Em *Portunus trituberculatus*, tratamentos com alta e baixa temperaturas levaram ao aumento de RNA mensageiro da HSP90 no hepatopâncreas e brânquias, supondo uma necessidade dessas proteínas para reparar proteínas desnaturadas (Zhang et al., 2009). Dois fenótipos de *Scylla paramamosain* quando submetidos a condições térmicas de 35 e 37°C apresentaram grande aumento da expressão de HSP70 nas brânquias e hepatopâncreas demonstrando assim que as HSPs possuem papel importante na termo-tolerância de *S. paramamosain* (Liu et al., 2018).

No órgão-Y, o frio parece causar o aumento das proteínas nos animais em pré-muda, mas a maioria dos estudos com as proteínas de choque térmico em decápodes investigou seus papéis na degradação muscular proteica e um elo entre a função esteroidogênica do órgão-Y e as HSPs precisa ser considerado. Células esteroidogênicas

de mamíferos, como as células do corpo lúteo, quando submetidas a um choque térmico aumentaram os níveis de HSP70, o que levou à inibição da esteroidogênese (Khanna et al., 1994; 1995). Como mencionado anteriormente, observou-se uma expressão maior das proteínas HSC70 e HSP90 no órgão-Y de animais em pré-muda submetidos a uma condição térmica de 19°C, estágio em que a ecdisteroidogênese estaria ativada. No entanto, como demonstrado em outro resultado, os baixos níveis de ecdisteroides a 19°C sugerem que a síntese está cessada. Tomados em conjunto, os dados sugerem que essa resposta ao frio pode ser consequência da redução na síntese de ecdisteroides pelo órgão-Y, relacionada ao aumento de ambas as HSPs após tratamento de baixa temperatura.

Ecdisteroides são moléculas lipofílicas que atuam sobre órgãos-alvos, como gônadas, hepatopâncreas, epiderme, brânquias e músculo (Chang et al., 1976; Spaziani et al., 1997; Böcking et al., 1995) através da ligação aos seus receptores nucleares (Hill et al., 2013; Shyamal et al., 2015; Hyde et al., 2019). Vários estudos têm relatado a função do hepatopâncreas no ciclo de muda. Uma análise multigênica do hepatopâncreas de *Cherax quadricarinatus* mostrou que este órgão é responsivo aos ecdisteroides. A maioria dos genes relacionados ao metabolismo de quitina, proteases e outras atividades celulares foi regulada negativamente, possivelmente devido a uma mudança da demanda energética do hepatopâncreas antes da ecdise. *Uca pugilator* apresentou alta expressão do *EcR* no hepatopâncreas durante a transição entre os estágios de intermuda e pré-muda, seguido de uma redução próximo a ecdise, sugerindo então que a expressão dos receptores de ecdisteroides independe de altos níveis de ecdisteroides (Chung et al., 1998). Por outro lado, no hepatopâncreas do *Metopograpsus messor*, foi observado um pico de expressão do *EcR* no final da pré-muda, quando um aumento dos níveis de ecdisteroides hemolinfáticos e da atividade secretora do órgão-Y foi reportado (Shyamal et al., 2015).

Poucos estudos têm investigado o efeito da temperatura na expressão do *EcR*, embora no inseto *Chironomus riparius* tenha sido descrito um aumento na expressão do heterodímero *EcR/USP* em temperaturas mais altas (Park e Kwak, 2014). Nossos resultados sugerem uma síntese constitutiva dos receptores de ecdisteroides no hepatopâncreas nos dois estágios e nas temperaturas mais elevadas, 24 e 29°C, mas que foi alterada quando os animais em pré-muda foram submetidos ao frio, elevando consideravelmente a expressão do receptor em comparação aos de intermuda na mesma temperatura. Este aumento pode ser uma forma de compensação aos baixos níveis de ecdisteroides na hemolinfa no frio.

A expressão de *EcR* no complexo neuroendócrino do pedúnculo óptico também já foi estabelecida. Este receptor está presente na região promotora do gene codificador do MIH e, quando os ecdisteroides atingem certos níveis circulantes, estes regulam positivamente a síntese de MIH via ligação a seus receptores (Techa e Chung, 2015; David et al., 2022). A expressão dos receptores no pedúnculo óptico de espécimes de *C. sapidus* investigados no nosso estudo apresentou-se maior nos indivíduos de intermuda em comparação aos de pré-muda, possivelmente pelo papel dos ecdisteroides na regulação positiva sobre a síntese do MIH na intermuda, período no qual este hormônio está atuando. Em *U. pugilator*, um acúmulo de ecdisteroides no pedúnculo óptico sugere que estes hormônios controlam a produção e a secreção do MIH (Hopkins, 1992). No que se refere ao efeito da temperatura sobre os *EcRs* no pedúnculo, não foi possível observar uma termo-dependência da expressão destes receptores.

A sinalização inibitória do ciclo de muda é mediada pelo MIH através do seu receptor no órgão-Y. O MIH é um hormônio peptídico e desde sua síntese até a secreção na hemolinfa passa por processos pós-traducionais. Para algumas espécies, a síntese do MIH é mantida em nível basal ao longo de todo o ciclo de muda, o que parece ser o caso

também em *C. sapidus*, uma vez que nenhuma variação foi observada entre os estágios nem entre as temperaturas investigadas no nosso estudo. No caranguejo *Carcinus maenas*, ambos a expressão e o conteúdo de MIH no órgão-X/glândula do seio não apresentaram diferenças entre os estágios de intermuda e pré-muda (Chung e Webster, 2003). Por outro lado, *Procambarus clarkii* exibiu alta concentração de MIH na glândula do seio nos sub-estágios iniciais da pré-muda, que é reduzida nos sub-estágios finais com a aproximação da ecdise (Nakatsuji et al., 2000). De acordo com Lee e colegas (1998), os níveis de RNA mensageiro de MIH são reduzidos do meio para o final da pré-muda e, na intermuda, tanto a síntese quanto a secreção são aumentadas.

Uma vez que os níveis de ecdisteroides foram consideravelmente reduzidos no frio, uma das nossas hipóteses era a inibição da síntese do hormônio da muda pelo MIH no órgão-Y. No entanto, ao considerarmos apenas a síntese do MIH, percebemos que não seria isso que estaria acontecendo. Em *C. maenas*, a afinidade do MIH pelo seu receptor nas células do órgão-Y não varia ao longo do ciclo de muda, e os autores sugerem que um importante mecanismo de sinalização intracelular poderia estar regulando a resposta ao MIH (Chung e Webster, 2003). Em nosso estudo, a expressão de CG-YO1, um dos candidatos a receptor de MIH no órgão-Y de *C. sapidus*, foi investigada como componente da sinalização inibitória do ciclo de muda. Embora nenhuma diferença tenha sido observada entre os estágios quando os animais foram submetidos às condições térmicas mais altas, o frio reduziu significativamente a expressão do receptor do MIH na pré-muda, sugerindo uma redução da sensibilidade do órgão-Y ao MIH por meio desse mecanismo. De acordo com a literatura, há evidências que a sinalização do MIH ao ligar-se em seu receptor é mediada por segundos mensageiros como AMPc e GMPc. De modo geral, o MIH liga-se a um receptor acoplado a proteína Gs responsável por aumentar os níveis de AMPc e ativar a PKA, que pode atuar diretamente sobre fatores de transcrição

ou abrir canais de cálcio dependentes de ligantes intracelulares. O aumento de cálcio no citosol ativa a cálcio-calmodulina quinase que, por sua vez, ativa a óxido nítrico sintase produzindo então óxido nítrico (NO). Uma guanilil ciclase solúvel é ativada por NO promovendo o aumento de GMPc que ativa a PKG inibindo assim a ecdisteroidogênese (Mykles e Chang, 2020). Neste contexto, considerando que os níveis de ecdisteroides a 19°C foram menores e que esta redução parece não estar sendo mediada pela sinalização do MIH sobre o receptor aqui avaliado, medições pós-traducionais do MIH e de outros receptores candidatos fazem-se necessárias para confirmarmos que não só a sua sinalização, mas outros fatores combinados levaram à inibição da ecdisteroidogênese.

Um dos outros componentes inibitórios candidatos para regular negativamente o órgão-Y é o CHH, que também influencia os níveis de ecdisteroides, mas de maneira menos eficiente (Webster e Keller, 1986). A expressão de CHH no pedúnculo óptico de adultos de *C. sapidus* é maior na intermuda quando comparada com a pré-muda a 29°C. Considerando apenas a intermuda, a temperatura mais alta elevou a síntese de CHH em comparação com as outras. Juvenis de *C. sapidus* submetidos a hipo- e hipertermia não mostraram alterações na expressão de CHH mensurada no complexo XO/SG e no órgão pericárdico quando comparados com animais na condição controle (Chung e Zmora, 2008). Nossos achados não nos permitem afirmar que CHH está de fato inibindo a muda em *C. sapidus*, mas podemos sugerir que a temperatura influencia sua expressão na intermuda.

O CHH, dentre outras funções, é responsável pela regulação da glicemia e é responsivo a condições estressoras (Durand, 1956; Kuo e Yang, 1999; Yildiz e Benli, 2004; Lorenzon et al., 2004; Powell e Rowley, 2008). Espécimes de *Portunus pelagicus* aclimatados a 28°C apresentaram aumento dos níveis hemolinfáticos quando foram transferidos para temperaturas de 24°C e 32°C, comparados com 26 e 30°C (Vasudevan

and Rajendran, 2021). Em lagostas *H. americanus*, o estresse térmico de 10°C acima da condição controle por 4 horas levou a um aumento nos níveis de CHH durante as primeiras 2 horas, retornando o mesmo aos níveis do controle nas horas seguintes (Chang, 2005).

No que diz respeito ao conteúdo proteico dos hormônios peptídicos discutidos acima, ambos apresentaram diminuição significativa no tecido durante o estágio de intermuda em comparação a pré-muda (Figura 15C). Estes resultados sugerem que estes hormônios estariam em maior concentração na hemolinfa em espécimes na intermuda uma vez que eles são constitutivamente secretados. Embora a dosagem hemolinfática precise ser investigada para confirmação, o balanço entre níveis teciduais e circulantes destes hormônios pode ser observado pela dosagem de CHH em células endócrinas do intestino e hemolinfa do caranguejo *Carcinus maenas* durante o ciclo de muda (Chung et al., 1999).

Tanto o MIH quanto o CHH são destacados como inibidores da síntese e secreção de ecdisteroides; no entanto, estes hormônios podem desempenhar papéis fundamentais em outros processos interligados ao ciclo muda, por ex. o CHH sobre o metabolismo de carboidratos em condições de estresse como temperatura (Chung et al., 2010). Embora uma maior secreção de CHH possa estar correlacionada aos baixos níveis de ecdisteroides na hemolinfa destes animais, nós hipotetizamos que o papel central deste hormônio está relacionado ao aumento do metabolismo energético exigido pelo estresse térmico seguido de uma osmoregulação compensatória durante a exposição ao frio na pré-muda. Notoriamente, o consumo de energia aumenta sob condição de baixas temperaturas para atender as necessidades metabólicas visando a garantir a homeostase.

Uma vez que o CHH promove a glicólise em resposta ao estresse ambiental (Chung et al., 2010), o aumento nos seus níveis na hemolinfa em resposta ao estresse pelo

frio pode ser observado, como reportado em *Cherax quadricarinatus* (Prymaczok et al., 2008). Além disto, o CHH atua como um importante osmorregulador (Chung et al., 1999; Liu et al., 2018), promovendo um aumento na osmolalidade e uma diminuição na concentração de amônia na hemolinfa (Si et al., 2019). Esse mecanismo permite que camarões e caranguejos possam reduzir a perda de calor ajustando a concentração iônica e a pressão osmótica do seu fluido corporal reduzindo assim a diferença entre a sua temperatura corporal e a ambiental (Ren et al., 2021).

7. CONCLUSÃO

O estudo proporcionou o conhecimento dos efeitos térmicos sobre órgãos-neuroendócrinos do siri-azul *Callinectes sapidus* envolvidos direta ou indiretamente no ciclo de muda da espécie. Em resumo, demonstramos que ocorrem alterações no conteúdo celular hepatopancreático de animais submetidos a diferentes desafios térmicos; que os níveis circulantes de ecdisteroides, colesterol e triglicérides também apresentam diferentes padrões entre as condições de temperatura testadas. Evidenciamos ainda que efeitos macroscópicos de retardo na ecdise em temperaturas frias podem ser reflexo do que vimos em nossos resultados, a redução dos níveis hemolinfáticos dos ecdisteroides. Quanto à expressão gênica das proteínas de choque térmico seu padrão parece ser órgão/temperatura dependente. Os órgãos-alvo para ecdisteroides, pedúnculo óptico e hepatopâncreas, apresentaram diferentes padrões de expressão gênica do receptor do hormônio em questão e, nesse contexto, salientamos que o hepatopâncreas torna-se mais responsivo aos ecdisteroides em temperaturas baixas na pré-muda. Avaliando etapas da via de inibição da muda consideradas no presente estudo, foi revelada uma expressão gênica constitutiva do hormônio inibidor da muda pelo pedúnculo óptico, enquanto o candidato a seu receptor no órgão-Y foi pouco expresso nos animais de pré-muda

submetidos ao frio, os mesmos que apresentaram baixas concentrações de ecdisteroides. Esses resultados em conjunto sugerem que essa redução não foi mediada pelo MIH, ao menos não por esse receptor. O CHH, por sua vez, apresentou maior expressão durante a intermuda, possibilitando-nos fazer uma ligação com o papel secundário deste hormônio na inibição da muda durante este estágio. No contexto da proteogenômica, por ser um estudo pioneiro, identificamos padrões moleculares de ambos os estágios de muda em condição controle, e demonstramos que as principais diferenças entre eles estão relacionadas a composição da cutícula e processos metabólicos. O agrupamento dos dados proteicos do pedúnculo ocular considerando todos os grupos experimentais revelou uma maior similaridade do grupo de animais em pré-muda submetidos a 19°C aos demais grupos de intermuda, fenômeno que chamamos de fenótipo de intermuda em resposta a baixa temperatura. Por fim, sugerimos que os hormônios peptídicos CHH e MIH estavam sendo secretados para atuarem durante a fase de intermuda e, por isso, o conteúdo proteico no pedúnculo ocular foi menor neste estágio em relação à pré-muda.

Tomados em conjunto nossos dados demonstram efeitos significativos mediados por diferentes temperaturas, em especial a temperatura mais fria. Mais investigações acerca da via de inibição do ciclo de muda devem ser realizadas para elucidar mecanismos subjacentes à redução dos níveis de ecdisteroides e consequente atraso da ecdise em temperaturas mais baixas.

8. REFERÊNCIAS

- Aaqillah-Amr, M. A., Hidir, A., Noordiyana, M. N. 2018. Morphological, biochemical and histological analysis of mud crab ovary and hepatopancreas at different stages of development. *Animal Reproduction Science*, v. 195, pp. 274-283. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.06.005.
- Abbineni, P. S., Tang, V. T., Leprevost, F. V., Basrur, V., Xiang, J., Nesvizhskii, A. I., Ginsburg, D. 2022. Identification of secreted proteins by comparison of protein abundance in conditioned media and cell lysates. *Analytical Biochemistry*, v. 655, 114846. doi: 10.1016/j.ab.2022.114846.
- Adams, D. H., Engel, M. E. 2014. Mercury, lead, and cadmium in blue crabs, *Callinectes sapidus*, from the Atlantic coast of Florida, USA: A multipredator approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 102, pp. 196-201. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.11.029.
- Afgan, E., Baker, D., van den Beek, M., Blankenberg, D., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Eberhard, C., Grüning, B., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Von Kuster, G., Rasche, E., Soranzo, N., Turaga, N., Taylor, J., Nekrutenko, A., Goecks, J. 2016. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, v. 44 (W1), W3–W10. doi: 10.1093/nar/gkw343.
- Alhoshi, M., Shehata, A.I., Habib, Y.J., Abdel-Latif, H.M., Wang, Y., Zhang, Z. 2022. Nutrigenomics in crustaceans: Current status and future prospects. *Fish & Shellfish Immunology*, v, 129, pp. 1-12. doi: 10.1016/j.fsi.2022.08.056.
- Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A. 1989. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology*, v. 101, pp. 535–544. doi: 10.1007/BF00541656.
- Andersen, S. V. 1999. Exoskeletal proteins from the crab, *Cancer pagurus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 123, i. 2, pp. 203-211. doi: 10.1016/S1095-6433(99)00051-3.
- Andersen, O., Johnsen, H., Wittmann, A. C., Harms, L., Thesslund, T., Berg, R. S., Siikavuopio, S., Mykles, D. L. 2022. De novo transcriptome assemblies of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) and snow crab (*Chionoecetes opilio*) molting gland and eyestalk ganglia - Temperature effects on expression of molting and growth regulatory genes in adult red king crab. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 257. doi: 10.1016/j.cbpb.2021.110678.

- Armengaud, J. 2022. Protecting our environment, a motivating outdoor game for proteomics! *Proteomics*, v. 22, i. 10, e2200055. doi: 10.1002/pmic.202200055.
- Becker, D., Reydelet, Y., Lopez, J. A., Jackson, C., Colbourne, J. K., Hawat, S., Hippler, M., Zeis, B., Paul, R. J. 2018. The transcriptomic and proteomic responses of *Daphnia pulex* to changes in temperature and food supply comprise environment-specific and clone-specific elements. *BMC Genomics*, v. 19, n. 376. doi: 10.1186/s12864-018-4742-6.
- Becker, G. L., Chen, C-H., Greenawalt, J. W., Lehninger, A. L. 1974. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. *The Journal of Cell Biology*, v. 61, i. 2, pp. 316-326. doi: 10.1083/jcb.61.2.316.
- Beckmann, R. B., Mizzen, L. A., Welch W. J. 1990. Interaction of HSP70 with newly synthesized proteins. Implications for protein folding and assembly. *Science*, v. 18, n. 248, pp. 850-854. doi: 10.1126/science.2188360.
- Bedulina, D., Drozdova, P., Gurkov, A., von Bergen, M., Stadler, P. F., Luckenbach, T., Timofeyev, T., Kalkhof, S. 2021. Proteomics reveals sex-specific heat shock response of Baikal amphipod *Eulimnogammarus cyaneus*. *Science of The Total Environment*, v. 763, 143008. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143008.
- Bittner, G. D., Kopanda, R. 1973. Factors influencing molting in the crayfish *Procambarus clarki*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 186, pp. 7-16. doi:10.1002/jez.1401860103.
- Böcking, D., Dauphin-Villemant, C., Lafont, R. 1995. Metabolism of 3-dehydroecdysone in the crayfish *Orconectes limosus* (Crustacea: Decapoda). *European Journal of Entomology*, v. 92, n. 1, pp. 63-74.
- Bonacina, L., Fasano, F., Mezzanotte, V., Fornaroli, R. 2023. Effects of water temperature on freshwater macroinvertebrates: a systematic review. *Biological Reviews*, v. 98, i. 1, pp. 191-221. doi: 10.1111/brv.12903.
- Bondad-Reantaso, M. G. Subasinghe R. P., Josupeit, H., Cai, J., Zhou, X. 2012. The role of crustacean fisheries and aquaculture in global food security: Past, present and future. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 110, i. 2, pp. 158-165. doi: 10.1016/j.jip.2012.03.010.
- Bultelle, F., Boutet, I., Devin, S., Caza, F., St-Pierre, Y., Péden, R., Brousseau, P., Chan, P., Vaudry, D., Le Foll, F., Fournier, M., Auffret, M., Rocher, B. 2021. Molecular response of a sub-antarctic population of the blue mussel (*Mytilus edulis platensis*) to a moderate thermal stress. *Marine Environmental Research*, v. 169:105393. doi: 10.1016/j.marenvres.2021.105393.

- Camacho, J., Qadri, S. A., Wang, H., Worden, M. K. 2006. Temperature acclimation alters cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Comparative Physiology A*, v. 192, pp. 1327–1334. doi: 10.1007/s00359-006-0162-1.
- Castejón, D., Rotlland, G., Alba-Tercedor, J., Font-i-Furnols, M., Ribes, E., Dufort, M., Guerao, G. 2019. Morphology and ultrastructure of the midgut gland ("hepatopancreas")
- Cerezer, C., Leitemperger, J. W., Amaral, A. M. B., Ferreira, B. C., Marins, A. T., Loro, V. L., Bartholomei-Santos, M. L., Santos, S. 2020. Raising the water temperature: consequences in behavior and biochemical biomarkers of the freshwater crab *Aegla longirostri* (Crustacea, Anomura). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, pp. 45349–45357. doi: 10.1007/s11356-020-10423-w.
- Cervellione, F., McGurk, C., Eriksen, T. B., Van den Broeck, W. 2017. Effect of starvation and refeeding on the hepatopancreas of whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone) using computer-assisted image analysis. *Journal of Fish Diseases*, v. 40, i. 11, pp. 1707-1715. doi: 10.1111/jfd.12639.
- Cesar, J. R. O., Yang, J. 2007. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α -Actin and β -Actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, pp. 554-559. doi: 10.1002/mrd.20605.
- Cesar, J. R. O., Yang, J. 2007. Expression patterns of ubiquitin, heat shock protein 70, α -Actin and β -Actin over the molt cycle in the abdominal muscle of marine shrimp *Litopenaeus Vannamei*. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, pp. 554-559. doi: 10.1002/mrd.20605.
- Chang, E. S. 1995. 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. doi:10.1016/0022-0981(95)00106-9.
- Chang, E. S. 2005. Stressed-Out Lobsters: Crustacean hyperglycemic hormone and stress proteins. *Integrative and Comparative Biology*, v. 45, n. 1, pp. 45-50.
- Chang, E. S., Keller, R., Chang, S. A. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. *General and Comparative Endocrinology*, v. 111 i. 3, pp: 359-366. doi: 10.1006/gcen.1998.7120.
- Chang, E. S., Sage, B., O'Connor, J. D., 1976. The qualitative and quantitative determinations of ecdysones in tissues of the crab, *Pachygrapsis crassipes*, following molt induction.

General and Comparative Endocrinology, v. 30, pp. 21–33. doi: 10.1016/0016-6480(76)90062-9.

- Chen, H. Y., Dillaman, R. M., Roer, R. D., Watson, R. D. 2012. 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 Molecular & Integrative Physiology*, v. 163, pp. 170-173.
- Chen, H. Y., Watson, R. D. 2011. 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.
- Chen, M. X., Zhu, F. Y., Gao, B., Ma, K. L., Zhang, Y., Fernie, A. R., Chen, X., Dai, L., Ye, N. H., Zhang, X., Tian, Y., Zhang, D., Xiao, S., Zhang, J., Liu, Y. G. 2020. Full-length transcript-based proteogenomics of rice improves its genome and proteome annotation. *Plant Physiology*, v. 182, i. 3, pp. 1510-1526. doi: 10.1104/pp.19.00430.
- Chen, T., Zhang, L-P., Wong, N-K., Zhong, M., Ren, C-H., Hu, C-Q. 2014. Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) is predominantly expressed in the brain and negatively regulates hepatopancreatic vitellogenin (VTG) gene expression. *Biology of Reproduction*, v. 90, i. 3, n. 47, pp. 1–10. doi: 10.1095/biolreprod.113.115030.
- Chiasson, S. C., Taylor, C. M. 2017. Effects of crude oil and oil/dispersant mixture on growth and expression of vitellogenin and heat shock protein 90 in blue crab, *Callinectes sapidus*, juveniles. *Marine Pollution Bulletin*, v. 119, pp. 128-132. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.04.048.
- Chung, A. C., Durica, D. S., Hopkins, P. M. 1998. Tissue-specific patterns and steady-state concentrations of ecdysteroid receptor and retinoid-X-receptor mRNA during the molt cycle of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 109, n. 3, pp. 375-389. doi: 10.1006/gcen.1997.7046.
- Chung, J. S., Dircksen, H., Webster, S. G. 1999. A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. *Pnas*, v. 96, n. 23, pp. 13103-13107. doi: 10.1073/pnas.96.23.13103.
- Chung, J. S., Zmora, N., Katayama, H., Tsutsui. 2010. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology*, v. 166, i. 3, pp. 447-454. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.12.011.

- Chung, J. S. 2010. 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. doi:10.1002/arch.20327.
- Chung, J. S., Webster, S. G. 2003. Moulting cycle-related changes in biological activity of moulting-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in the crab, *Carcinus maenas*. From target to transcript. European Journal of Biochemistry, v. 270, pp. 3280-3288. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03720.x.
- Chung, J. S., Zmora, N. 2008. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus* the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. The FEBS Journal, v. 275, n. 4, pp. 693-704. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.06231.x.
- Chung, J. S., Pitula, J. S., Schott, E., Alvarez, J. V., Maurer, L., Lycett, K. A. 2015 Elevated water temperature increases the levels of reo-like virus and selected innate immunity genes in hemocytes and hepatopancreas of adult female blue crab, *Callinectes sapidus*. Fish & Shellfish Immunology, v. 47, n. 1, pp. 511-20. doi: 10.1016/j.fsi.2015.09.027.
- Cogne, Y., Gouveia, D., Chaumot, A., Degli-Esposti, D., Geffard, O., Pible, O., Almunia, C., Armengaud, J. 2020. Proteogenomics-guided evaluation of rna-seq assembly and protein database construction for emergent model organisms. Proteomics, v. 20, i. 10, 1900261. doi: 10.1002/pmic.201900261.
- Cunningham, S. R., Darnell, M. Z. 2015. Temperature-dependent growth and molting in early juvenile blue crabs *Callinectes sapidus*. Journal of Shellfish Research, v. 34, n. 2, pp. 505-510. doi: 10.2983/035.034.0246.
- Cuzin-Roudy, J., Strambi, C., Strambi, A., Delbecq, J-P. 1989. Hemolymph ecdysteroids and molt cycle in males and females of *Siriella armata* M.-Edw. (Crustacea: Mysidacea): Possible control by the MI-ME X-organ of the eyestalk. General and Comparative Endocrinology, v. 74, i. 1, pp. 96-109. doi: 10.1016/0016-6480(89)90118-4.
- Das, S., Vraspir, L., Zhou, W., Durica, D. S., Mykles, D. L. 2018. Transcriptomic analysis of differentially expressed genes in the molting gland (Y-organ) of the blackback land crab, *Gecarcinus lateralis*, during molt-cycle stage transitions. Comparative Biochemistry Physiology Part D Genomics Proteomics, v. 28, pp. 37-53. doi: 10.1016/j.cbd.2018.06.001.
- David, D. D., de Assis, L. V. M., Moraes, M. N., Zanotto, F. P., Castrucci, A. M. L. 2022. *CasEcR* and *CasMIH* genes in the blue crab, *Callinectes sapidus*: a temporal evaluation

- and melatonin effects. *Frontiers in Physiology*, v. 13, 903060. doi: 10.3389/fphys.2022.903060.
- Diez, M. J., Lovrich, G. A. 2013. Moulting cycle and growth of the crab *Halicarcinus planatus* (Brachyura, Hymenosomatidae) in the Beagle Channel, southern tip of South America. *Helgolander Marine Research*, v. 67, pp. 555–566. doi: 10.1007/s10152-012-0343-y.
- Durand, J. B. 1956. Neurosecretory cell types and their secretory activity in the crayfish. *The Biological Bulletin*, v. 111, n. 1, pp. 62–76. doi:10.2307/1539184.
- during ontogeny in the common spider crab *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura, Majidae). *Arthropod Structure & Development*, v. 49, pp. 137–151. doi: 10.1016/j.asd.2018.11.013.
- Epifanio, C. E. 2019. Early life history of the blue crab *Callinectes sapidus*: a review. *Journal of Shellfish Research*, v. 38, n. 1, p. 1-22. doi: 10.2983/035.038.0101.
- Erde, J., Loo, R. R. O., Loo, J. A. 2014. Enhanced FASP (eFASP) to increase proteome coverage and sample recovery for quantitative proteomic experiments. *Journal of Proteome Research*, v. 13, i. 4, pp. 1885–1895. doi: 10.1021/pr4010019.
- Espinosa, C., Becker, M., Marić, I., Wong, R. J., Shaw, G. M., Gaudilliere, B., Aghaepour, N., Stevenson, D. K., Stelzer, I. A., Peterson, L. S., Chang, A. L., Xenochristou, M., Phongpreecha, T., De Francesco, D., Katz, M., Blumenfeld, Y. J., Angst, M.S. 2021 Data-driven modeling of pregnancy-related complications *Trends in Molecular Medicine*, v. 27, i. 8, pp. 762-776. doi: 10.1016/j.molmed.2021.01.007.
- Evans, V. C., Barker, G., Heesom, K. J., Fan, J., Bessant, C., Matthews, D. A. 2012. De novo derivation of proteomes from transcriptomes for transcript and protein identification. *Nature Methods*, v. 9, pp. 1207–1211 (2012). doi: 10.1038/nmeth.2227.
- Fanello, L., Burger, T. 2022. An analysis of proteogenomics and how and when transcriptome-informed reduction of protein databases can enhance eukaryotic proteomics. *Genome Biology*, v. 23, n. 132. doi: 10.1186/s13059-022-02701-2.
- FAO. 2020. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action*. Rome. doi: 10.4060/ca9229en.
- Foguesatto, K., Bastos, C. L. Q., Boyle, R. T., Nery, L. E. M., Souza, M. M. 2019. Participation of Na⁺/K⁺-ATPase and aquaporins in the uptake of water during moulting processes in the shrimp *Palaemon argentinus* (Nobili, 1901). *Journal of Comparative Physiology, Part B*, v. 189, pp. 523 – 535. doi: 10.1007/s00360-019-01232-w.

- Freeman, J. A., Kilgus, G., Laurendeau, D., Perry, H. M. 1987. Postmolt and intermolt molt cycles stages of *Callinectes sapidus*. *Aquaculture*, v. 61, pp. 201-209. doi: 10.1016/0044-8486(87)90149-9.
- Fungwe, T. V., Cagens, L. M. Cook, G. A., Wilcox, H. G., Heimberg, M. 1993. Dietary cholesterol stimulates hepatic biosynthesis of triglyceride and reduces oxidation of fatty acids in the rat. *Journal of Lipid Research*, v. 34, pp. 933-941. doi: 10.1016/S0022-2275(20)39680-2.
- Gao, B., Lv, J., Meng, X., Li, J., Li, Y., Liu, P., & Li, J. 2022. Full-length transcriptome construction of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Frontiers in Marine Science*, v. 9, 922188. doi: 10.3389/fmars.2022.922188.
- Garland, M. A., Stillman, J. H., Tomanek, L. 2015. The proteomic response of cheliped myofibril tissue in the eurythermal porcelain crab *Petrolisthes cinctipes* to heat shock following acclimation to daily temperature fluctuations. *The Journal of Experimental Biology*, v. 218, pp. 388-403. doi: 10.1242/jeb.112250. PMID: 25653421.
- Gbotsyo, Y. A., Rowarth, N. M., Weir, L. K., MacRae, T. H. 2020. Short-term cold stress and heat shock proteins in the crustacean *Artemia franciscana*. *Cell Stress and Chaperones*, v. 25, pp. 1083-1097. doi: 10.1007/s12192-020-01147-4.
- Gimenez, A. V. F., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A., Fenucci, J. L. 2001. Digestive proteinases of red shrimp *Pleoticus muelleri* (Decapoda, Penaeoidea): partial characterization and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 130, i. 3, pp.331-338. doi: 10.1016/S1096-4959(01)00437-7.
- Gimenez, A. V. F., García-Carreño, F. L., Navarrete del Toro, M. A., Fenucci, J. L. 2002. Digestive proteinases of *Artemesia longinaris* (Decapoda, Penaeidae) and relationship with molting. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 132, i. 3, pp. 593-598. doi: 10.1016/S1096-4959(02)00080-5.
- Gong, J., Yu, K., Shu, L., Ye, H., Li, S., Zeng, C. 2015. 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. doi: 10.1016/j.jembe.2014.12.008.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J. 2019. Ecotoxicoproteomics: A

- decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics*, v. 198, pp. 66-77. doi: 10.1016/j.jprot.2018.12.001.
- Graves, P. R., Haystead, T. A. J. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 66, i. 1, pp. 39-63. doi: 10.1128/MMBR.66.1.39-63.2002.
- Guan, W., Wei, X., Nong, W., Shao, Y., Mao, L. 2021. Heat shock protein 70 (HSP70) promotes air exposure tolerance of *Litopenaeus vannamei* by preventing hemocyte apoptosis. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 114, 103844. doi: 10.1016/j.dci.2020.103844.
- Halal, L. M., Ayres, B. S., Lima, T. M., Maciel, F. E., Nery, L. E. M. 2020. High temperature acclimation alters the emersion behavior in the crab *Neohelice granulata*. *Journal of Thermal Biology*, v. 91, 102617. doi: 10.1016/j.jtherbio.2020.102617.
- Hamid, Z., Zimmerman, K. D., Guillen-Ahlers, H., Li, C., Nathanielsz, P., Cox, L. A., Olivier, M. 2022. Assessment of label-free quantification and missing value imputation for proteomics in non-human primates. *BMC Genomics*, v. 23, n. 496. doi: 10.1186/s12864-022-08723-1.
- Hartnoll, R. G. 1978. The Determination of Relative Growth in Crustacea. *Crustaceana*, v. 34, n. 3, pp. 281-293. <https://www.jstor.org/stable/20103283>.
- Head, T. B., Mykles, D. L., Tomanek, L. 2019. Proteomic analysis of the crustacean molting gland (Y-organ) over the course of the molt cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 29, pp. 193-210. doi: 10.1016/j.cbd.2018.11.011.
- Heck, M., Neely, B. A. 2020 Proteomics in non-model organisms: A new analytical frontier. *Journal of Proteome Research*, v. 19, i. 9, pp. 3595-3606. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00448
- Hensi, M. A., Shabanipour, N., Atabati, A., Bitaraf, A. 2008. 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.
- Hensi, M. A., Shabanipour, N., Atabati, A., Bitaraf, A. 2008. 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.
- Hill, R. J., Billas, I. M. L., Bonneton, F., Graham, L. D., Lawrence, M. C. 2013. Ecdysone receptors: from the Ashburner model to structural biology. *Annual Review Entomology*, v. 58, pp. 251-271. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153610.

- Hines, A. H., Lipcius, R. N., Haddon, A. M. 1987. 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. doi:10.3354/meps036055.
- Havens, K. J., Mcconaugha, J. R. 1990. Molting in the mature female blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Bulletin of Marine Science*, v. 46, n. 1, pp. 37-47.
- Hopkins, P. 1992. Hormonal control of the molt cycle in the fiddler crab *Uca pugilator*. *Integrative and Comparative Biology*, v. 32, pp. 450-458. doi: 10.1093/ICB/32.3.450.
- Hu, K-J., Leung, P-C. 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, v. 146, i. 1, pp. 69-80. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.09.010.
- Huang, S., Wang, J., Yue, W., Chen, J., Gaughan, S., Lu, W., Lu, G., Wang, C. 2015. Transcriptomic variation of hepatopancreas reveals the energy metabolism and biological processes associated with molting in Chinese Mitten Crab, *Eriocheir sinensis*. *Scientific Reports*, v. 5 n. 1, pp. 1–11. doi:10.1038/srep14015.
- Huchin-Mian, J. P., Small, H. J., Shields, J. D. 2018. The influence of temperature and salinity on mortality of recently recruited blue crabs, *Callinectes sapidus*, naturally infected with *Hematodinium perezii* (Dinoflagellata). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 152, pp. 8-16. doi: 10.1016/j.jip.2018.01.003.
- Hyde, C. J., Elizur, A., Ventura, T. 2019. The crustacean ecdysone cassette: A gatekeeper for molt and metamorphosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 185, pp. 172-183. doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.08.012.
- Jain, B. P., Pandey, S. 2018. WD40 Repeat Proteins: Signalling Scaffold with Diverse Functions. *The Protein Journal*, v. 37, pp. 391–406. doi: 10.1007/s10930-018-9785-7.
- Jayasankar, V., Tomy, S., Wilder, M. N. 2020. Insights on molecular mechanisms of ovarian development in decapod crustacea: focus on vitellogenesis-stimulating factors and pathways. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 11:577925. doi: 10.3389/fendo.2020.577925.
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saido-Sakanaka, H., Yang, W. J., Okuno, A., Tran, T. T. H., Aida, K., Wilder, M. N. 2002. Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *The Journal of Experimental Zoology*, v. 293, i. 7, pp. 675-682. doi: 10.1002/jez.10167.

- Jiang, L., Wang, M., Lin, S., Jian, R., Li, X., Chan, J., Dong, G., Fang, H., Robinson, A. E., GTEEx Consortium, Snyder, M. P. A Quantitative Proteome Map of the Human Body. *Cell*, v. 183, i. 1, pp. 269-283. doi: 10.1016/j.cell.2020.08.036.
- Jivoff, P., Hines, A. H., Quackenbush, L. S. 2007. Reproduction biology and embryonic development. In VS Kennedy & E Cronin eds. *Biology of the Blue Crab*. College Park, Maryland Sea Grant Program, pp. 257-298.
- Junprung, W., Supungul, P., Tassanakajon, A. 2021. Structure, gene expression, and putative functions of crustacean heat shock proteins in innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 115, 103875. doi: 10.1016/j.dci.2020.103875.
- Khanna, A., Aten, R. F., Behrman, H. R. 1994. Heat shock protein induction blocks hormone-sensitive steroidogenesis in rat luteal cells. *Steroids*, v. 59, n. 1, pp. 4-9. doi: 10.1016/0039-128x(94)90037-x.
- Khanna, A., Aten, R. F., Behrman, H. R. 1995. Heat shock protein-70 induction mediates luteal regression in the rat. *Molecular Endocrinology*, v. 9, n. 11, pp. 1431-1440. doi: 10.1210/mend.9.11.8584020.
- Kleinholz, L. H. 1976. Crustacean neurosecretory hormones and physiological specificity. *American Zoologist*, v. 16, i. 2, pp. 151–166. doi: 10.1093/icb/16.2.151.
- Korkut, G. G., Söderhäll, I., Söderhäll, K., Noonin, N. 2018. The effect of temperature on bacteria-host interactions in the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 157, pp. 67-73. doi: 10.1016/j.jip.2018.08.001.
- Kornthong, N., Duangprom, S., Suwansa-ard, S., Saetan, J., Phanaksri, T., Songkoomkrong, S., Kheowkae, S., Pollawat, J., Sobhon, P. 2019. Molecular characterization of a vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH) in the mud crab (*Scylla olivacea*) and temporal changes in abundances of VIH mRNA transcripts during ovarian maturation and following neurotransmitter administration. *Animal Reproduction Science*, v. 208. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.106122.
- Kuo, C. M., Yang, Y. H. 1999. Hyperglycemic responses to cold shock in the freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Comparative Physiology*, v. 169, pp. 49–54. doi: 10.1007/s003600050192.
- Kuballa, A. V., Holton, T. A., Paterson, B., Elizur, A. 2011. Moults cycle specific differential gene expression profiling of the crab *Portunus pelagicus*. *BMC Genomics*, v. 12, n. 147. doi: 10.1186/1471-2164-12-147.

- Lachaise, F., Roux, A. L., Hubert, M., Lafont, R. 1993. The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (A Review). *Journal of Crustacean Biology*, v. 13, n. 2, 198–234. doi:10.1163/193724093X00020.
- Lee, K. J., Watson, R. D., and Roer, R. D. 1998. Molt-inhibiting hormone mRNA levels and ecdysteroid titer during a molt cycle of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biochem. Biochemical and Biophysical Research Communications* v. 249, n. 3, pp. 624–627. doi:10.1006/bbrc.1998.9215.
- Leffler, C.W. 1972. Some effects of temperature on the growth and metabolic rate of juvenile blue crabs, *Callinectes sapidus*, in the laboratory. *Marine Biology*, v. 14, pp. 104–110. doi: 10.1007/BF00373209.
- Legrand, E., Bachvaroff, T., Schock, T. B., Chung, J. S. 2021. Understanding molt control switches: Transcriptomic and expression analysis of the genes involved in ecdysteroidogenesis and cholesterol uptake pathways in the Y-organ of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *PLoS ONE*, v. 16, i. 9, e0256735. doi: 35.10.1371/journal.pone.0256735.
- Li, H., Zhou, R., Xu, S., Chen, X., Hong, Y., Lu, Q., Liu, H., Zhou, B., Liang, X. 2020 Improving gene annotation of the peanut genome by integrated proteogenomics workflow. *Journal of Proteome Research*, v. 19, i. 6, pp. 2226-2235. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00723.
- Liang, J-P., Zhang, W-L., Li, H., Li, J-T., Li, J. 2020. Abundances of vitellogenin and heat shock protein 90 during ovarian and embryonic development of *Exopalaemon carinicauda*. *Animal Reproduction Science*, v. 223, 106633. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106633.
- Liu, L., Fu, Y., Xiao, L., Liu, X., Fang, W., Wang, C. 2021. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the hepatopancreas in *Scylla paramamosain* during the molting cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 40, 100870. doi: 10.1016/j.cbd.2021.100870.
- Liu, M., Sun, C., Zheng, X., Zhou, Q., Liu, B., Zhou, Y., Xu, P., Liu, B. 2022. Comparative proteomic analysis revealed the mechanism of tea tree oil targeting lipid metabolism and antioxidant system to protect hepatopancreatic health in *Macrobrachium rosenbergii*. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 906435. doi: 10.3389/fimmu.2022.906435.
- Liu, Z-M., Zhu, X-L., Lu, J., Cai, W-J., Ye, Y-P., Lv, Y-P. 2018. Effect of high temperature stress on heat shock protein expression and antioxidant enzyme activity of two morphs of the mud crab *Scylla paramamosain*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 223, pp. 10-17. doi: 10.1016/j.cbpa.2018.04.016.

- Liu, Z., Zhou, Z., Wang, L., Li, M., Wang, W., Yi, Q., Huang, S., Song, L. 2018. Dopamine and serotonin modulate free amino acids production and Na⁺/K⁺ pump activity in chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* under acute salinity stress. *Frontiers in Physiology*, v. 9, 01080. doi: 10.3389/fphys.2018.01080.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, v. 25, n. 4, pp. 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- Lorenzon, S., Edomi, P., Giulianini, P. G., Mettulio, R., Ferrero, E. A. 2004. Variation of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) level in the eyestalk and haemolymph of the shrimp *Palaemon elegans* following stress. *The Journal of Experimental Biology*, v. 207, pp. 4205–4213. doi: 10.1242/jeb.01264.
- Luo, X., Chen, T., Zhong, M., Jiang, X., Zhang, L., Ren, C., Hu, C. 2015. 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. doi: 10.1016/j.peptides.2014.11.002.
- Lv, J., Zhang, L., Liu, P., Li, J. 2017. Transcriptomic variation of eyestalk reveals the genes and biological processes associated with molting in *Portunus trituberculatus*. *PLoS ONE*, 12(4): e0175315. doi: 10.1371/journal.pone.0175315.
- Ma, B., Johnson, R. 2012. De novo sequencing and homology searching. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, v. 11, i. 2, O111.014902. doi: 10.1074/mcp.O111.014902.
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H. N., Diniz, M. S., Vinagre, C. 2012. Thermal tolerance of the crab *Pachygrapsus marmoratus*: intraspecific differences at a physiological (CTMax) and molecular level (Hsp70). *Cell Stress Chaperones*, v. 17 i. 6, pp. 707-716. doi: 10.1007/s12192-012-0345-3.
- Mancinelli, G., Bardelli, R., Zenetos, A. 2021. A global occurrence database of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus*. *Scientific Data*, v. 8, n. 111, pp. 1-10. doi: 10.1038/s41597-021-00888-w.
- Martin-Creuzburg, D., Westerlund, S. A., Hoffmann, K. H. 2007. Ecdysteroid levels in *Daphnia magna* during a molt cycle: Determination by radioimmunoassay (RIA) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS). *General and Comparative Endocrinology*, v. 151, i. 1, pp. 66-71. doi: 10.1016/j.yggen.2006.11.015.
- Martín-Folgar, R., de la Fuente, M., Morcillo, G., Martínez-Guitarte, J. L. 2015. Characterization of six small HSP genes from *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae): Differential expression under conditions of normal growth and heat-

- induced stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 188, pp. 76-86. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.06.023.
- Mat, A. M., Dunster, G. P., Sbragaglia, V., Aguzzi, J., de la Iglesia, H. O. 2017. Influence of temperature on daily locomotor activity in the crab *Uca pugilator*. *Plos One*, 12(4):e0175403. doi:10.1371/journal.pone.0175403.
- McKinney, D. A., Strand, M. R., and Brown, M. R. 2017. Evaluation of ecdysteroid antisera for a competitive enzyme immunoassay and extraction procedures for the measurement of mosquito ecdysteroids. *General Comparative Endocrinology*, v. 253, pp. 60–69. doi:10.1016/j.ygcen.2017.08.028.
- Meng, X-L., Liu, P., Li, J., Gao, B-Q., Chen, P. 2014. Physiological responses of swimming crab *Portunus trituberculatus* under cold acclimation: Antioxidant defense and heat shock proteins. *Aquaculture*, v. 434, pp. 11-17. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.07.021.
- Mengal, K., Kor, G., Kozák, P., Niksirat, H. 2023. Heat shock proteins adaptive responses to environmental stressors and implications in health management of decapods. *Aquaculture Reports*, v. 30, 101564. doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101564.
- Mrak, P., Bogataj, U., Strus, J., Znidarsic, N. 2017. Cuticle morphogenesis in crustacean embryonic and postembryonic stages. *Arthropod Structure & Development*, v. 46, i. 1, pp. 77-95. doi: 10.1016/j.asd.2016.11.001.
- Mykles D. L. 2011 Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 127, pp. 196-203. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.09.001.
- Mykles, D. L. 2021. Signaling Pathways That Regulate the Crustacean Molting Gland. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, 674711. doi: 10.3389/fendo.2021.674711.
- Mykles, D. L., Chang, E. S. 2020. Hormonal control of the crustacean molting gland: Insights from transcriptomics and proteomics. *General and Comparative Endocrinology*, v. 294. doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113493.
- Nagaraju, G. P. C. 2007. Is methyl farnesoate a crustacean hormone? *Aquaculture*, v. 272, i. 1-4, pp. 39-54. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.05.014.
- Nagaraju, G. P. C. 2011. Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview. *The Journal of Experimental Biology*, v. 214, i. 1, pp. 3-16. doi: 10.1242/jeb.047183.
- Nagaraju, G. P. C., Reddy, P. R., Reddy, P. S. 2006. 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. doi: 10.1111/j.1444-2906.2006.01164.x.

- Nagasawa, H. 2012. The crustacean cuticle: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience (Ed Elite)*, v.4, n. 2, pp. 711–720. doi: 10.2741/e412.
- Nakatsuji, T., Keino, H., Tamura, K., Yoshimura, S., Kawakami, T., Aimoto, S., Sonobe, H. 2000. Changes in the amounts of the molt-inhibiting hormone in sinus glands during the molt cycle of the american crayfish, *Procambarus clarkii*. *Zoological Science*, v. 17, n. 8, pp. 1129–1136. doi:10.2108/zsj.17.1129.
- Nakatsuji, T., Sonobe, H. 2004. 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. doi:10.1016/j.ygcen.2003.11.001.
- Nery, L. E. M., Castrucci, A. M. L. 1997. Pigment cell signalling for physiological color change. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Physiology*, v. 118, n. 4, pp. 1135-1144. doi: 10.1016/s0300-9629(97)00045-5.
- Nery, L. E. M., Castrucci, A. M. L. 2002. Crustacean chromatophore: endocrine regulation and intracellular signalling systems. *The Crustacean Nervous System*, pp. 98-112. doi: 10.1007/978-3-662-04843-6_7.
- Nesvizhskii, A. I. 2014 Proteogenomics: concepts, applications and computational strategies. *Nature Methods*, v. 11, i. 11, pp. 1114–1125. doi: 10.1038/nmeth.3144.
- Nicholas, M. W., Alina, T., Mike, R. H., Bernard, M. D. 2009. Evolution of a Novel Carotenoid-Binding Protein Responsible for Crustacean Shell Color. *Molecular Biology and Evolution*, v. 26, i. 8, pp. 1851–1864. doi: 10.1093/molbev/msp092.
- NMFS. 2017. Fisheries Economics of the United States, 2015. National Marine Fisheries Service. U.S. Dept. of Commerce, NOAA Tech. Memo. NMFS-F/SPO-170, 247 p. <https://repository.library.noaa.gov/view/noaa/16121>.
- Osayande, O., Zou, E. 2022. Lead inhibits postecdysial exoskeletal calcification in the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 41, i. 2, pp. 474-482. doi: 10.1002/etc.5273.
- Pamuru, R. R., Rosen, O., Manor, R., Chung, J. S., Zmora, N., Glazer, L., Aflalo, E. D., Weil, S., Tamone, S. L., Sagi, A. 2012. Stimulation of molt by RNA interference of the molt-inhibiting hormone in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 178, i. 2, pp. 227-236. doi: 10.1016/j.ygcen.2012.05.007.
- Park, K., Kwak, I-S. 2014. The effect of temperature gradients on endocrine signaling and antioxidant gene expression during *Chironomus riparius* development. *Science of the Total Environment*, v. 470, pp 1008-1011. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.10.052.

- Pervaiz, P. A., Sudan, M., Manohar, S. 2015. 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.
- Phlippen, M. K., Webster, S. G., Chung, J. S., Dirksen, H. 2000. Ecdysis of decapod crustaceans is associated with a dramatic release of crustacean cardioactive peptide into the haemolymph. Journal of Experimental Biology, v. 203, i. 3, pp. 521–536. doi: 10.1242/jeb.203.3.521.
- Powell, A., Rowley, A. F. 2008. Hemolymph changes in the shore crab, *Carcinus maenas*, infected by the parasite barnacle, *Sacculina carcini*. Diseases of Aquatic Organisms, v. 80, pp. 75–79. doi: 10.3354/dao01930.
- Proespraiwong, P., Tassanakajon, A., Rimphanitchayakit, V. 2010. Chitinases from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*: Phylogenetics, expression and activities, Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology, v. 156, i. 2, pp. 86-96. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.02.007.
- Prymaczok, N. C., Medesani, D. A., Rodríguez, E. M. 2008. Levels of ions and organic metabolites in the adult freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, exposed to different salinities. Marine and Freshwater Behaviour and Physiology, v. 41, i. 2, pp. 121-130. doi: 10.1080/10236240802193893.
- Quackenbush, L. S. 1986. Crustacean endocrinology, a review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 43, n. 11, pp. 2271-2282. doi:10.1139/f86-278.
- Quesada, R. J., Smith, C. D., Hear, D. J. 2011. Evaluation of parenteral drugs for anesthesia in the blue crab (*Callinectes sapidus*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, v. 42, n. 2, pp. 295-299. doi: 10.1638/2009-0071.1.
- Reddy, P. R., Nagaraju, G. P. C., Reddy, P. S. 2004. Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex*. Journal of Crustacean Biology, v. 24, i. 3, pp. 511-515. doi: 10.1651/C-2478.
- Ren, X., Wang, Q., Shao, H., Xu, Y., Liu, P., Li, J. 2021. Effects of low temperature on shrimp and crab physiology, behavior, and growth: A review. Frontiers in Marine Science, v. 8, 746177. doi: 10.3389/fmars.2021.746177.
- Ritossa, F. M. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. Experientia, v. 18, pp. 571-573. doi: 10.1007/BF02172188.
- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y. Y. 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a

review. *Journal of Fish Diseases*, v. 33, pp. 789-801. doi:10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x.

- Rodrigues, M. A., D'incao, F. 2008. 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.
- Roer, R., Abehsera, S., Sagi, A. 2015. Exoskeletons across the pancrustacea: comparative morphology, physiology, biochemistry and genetics. *Integrative and Comparative Biology*, v. 55, i. 5, pp. 771–791. doi: 10.1093/icb/iev080.
- Röszer, T. 2014. The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell Tissue Research*, v. 358, pp. 685-695. doi: 10.1007/s00441-014-1985-7.
- Ruggles, K. V., Krug, K., Wang, X., Clauser, K. R., Wang, J., Payne, S. H., Fenyö, D., Zhang, B., Mani, D. R. 2017. Methods, tools and current perspectives in proteogenomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 16, i. 6, pp. 959-981. doi: 10.1074/mcp.MR117.000024.
- Ruiz-Orera, J., Messeguer, X., Subirana, J. A., Alba, M. M. 2014. Long non-coding RNAs as a source of new peptides. *eLife*, v. 3, e03523. doi: 10.7554/eLife.03523.
- Santos, E. A., Keller, R. 1993. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and the regulation of carbohydrate metabolism: Current perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology*, v. 106, i. 3, pp. 405-411. doi: 10.1016/0300-9629(93)90234-U.
- Scudiero, R., Verderame, M., Motta, C. M., Migliaccio, V., Simoniello, P. 2019. HSP70 localization in *Podarcis siculus* embryos under natural thermal regime and following a non-lethal cold shock. *Comptes Rendus Biologies*, v. 342, pp. 299-308. doi: 10.1016/j.crv.2019.10.001.
- Selvakumar, S., Geraldine, P. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 140, pp. 209-215. doi: 10.1016/j.cbpb.2005.01.008.
- Sheen, S-S., Liu, P-G., Chen, S-N., Chen, J-C. 1994. Cholesterol requirement of juvenile tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, v. 125, pp. 131-137. doi: 10.1016/0044-8486(94)90289-5.
- Shi, W., Hu, R., Wang, P., Zhao, R., Shen, H., Li, H., Wang, L., Qiao, Y., Jiang, G., Cheng, J., Wan, X. 2022. Transcriptome analysis of acute high temperature-responsive genes and

- pathways in *Palaemon gravieri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 41, 100958. doi: 10.1016/j.cbd.2021.100958.
- Shyamal, S., Anilkumar, G., Bhaskaran, R., Doss, G. P. Durica. 2015. Significant fluctuations in ecdysteroid receptor gene (*EcR*) expression in relation to seasons of molt and reproduction in the grapsid crab, *Metopograpsus messor* (Brachyura: Decapoda). *General and Comparative Endocrinology*, v. 211, pp. 39-51. doi: 10.1016/j.ygcen.2014.11.006.
- Si, L., Pan, L., Zhang, X., Wang, H., Wei, C. 2019. Evidence that dopamine is involved in neuroendocrine regulation, gill intracellular signaling pathways and ion regulation in *Litopenaeus vannamei*. *The Journal of Experimental Biology*, 222(Pt 15):jeb204073. doi: 10.1242/jeb.204073.
- Skinner, D. M. 1962. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *The Biological Bulletin*, v. 123, n. 3, pp. 635-647. doi: 10.2307/1539584.
- Skinner, D. M. 1985. Interacting factors in the control of the crustacean molt cycle. *American Zoologist*, v. 25, i. 1, pp. 275–284. doi:10.1093/icb/25.1.275.
- Snyder, M. J., Chang, E. S. 1991. Ecdysteroids in relation to the molt cycle of the American lobster, *Homarus americanus*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 81, n. 1, pp. 133-145. doi: 10.1016/0016-6480(91)90133-Q.
- Spaziani, E., DeSantis, K., O'Rourke, B. D., Wang, W. L., Weld, J. D. 1997. The clearance in vivo and metabolism of ecdysone and 3-dehydroecdysone in tissues of the crab *Cancer antennarius*. *Journal of Experimental Zoology*, v. 279, pp. 609-619. doi: 10.1002/(SICI)1097-010X(19971215)279:6<609::AID-JEZ9>3.0.CO;2-R.
- Spaziani, E., Mattson, M. P., Wang, W. L., McDougall, H. E. 1999. Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean y-organs. *American Zoologist*, v. 39, i. 3, pp. 496–512. doi: 10.1093/icb/39.3.496.
- Spees, J. L., Chang, S. A., Mykles, D. L., Snyder, M. J., Chang, E. S. 2003. Molt cycle dependent molecular chaperone and polyubiquitin gene expression in lobster. *Cell Stress & Chaperones*, v. 8, n. 3, pp. 258-264. doi: 10.1379/1466-1268(2003)008<0258:mcmcap>2.0.co;2.
- Spindler, K-D., Anger, K. 1986. Ecdysteroid levels during the larval development of the spider crab *Hyas araneus*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 64, pp. 122-128. doi: 10.1016/0016-6480(86)90037-7.
- Stillman, J. H. 2019. Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. *Physiology (Bethesda)*, v. 34, i. 2, pp. 86-100. doi: 10.1152/physiol.00040.2018.

- Stoner, A. W., Copeman, L. A., Ottmar, M. L. 2013. Molting, growth, and energetics of newlysettled blue king crab: Effects of temperature and comparisons with red king crab. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 442, pp. 10-21. doi: 10.1016/j.jembe.2013.02.002.
- Subramoniam, T. 2011. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Science*, v. 77, pp. 1-21. doi: 10.1007/s12562-010-0301-z.
- Tajiri, R., Ogawa, N., Fujiwara, H., Kojima, T. 2017. Mechanical Control of Whole Body Shape by a Single Cuticular Protein Obstructor-E in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, v. 13, i. 1, e1006548. doi: 10.1371/journal.pgen.1006548.
- Tamone, S. L., Adams, M. M., Dutton, J. M. 2005. Effect of eyestalk-ablation on circulating ecdysteroids in hemolymph of snow crabs, *Chionoecetes opilio*: physiological evidence for a terminal molt. *Integrative and Comparative Biology*, v.45, i. 1, pp. 166–171. doi: 10.1093/icb/45.1.166.
- Tamone, S. L., Chang, E. S. 1993. Methyl farnesoate stimulates ecdysteroid secretion from crab Y-organs in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, v. 89, i. 3, pp. 425-432. doi: 10.1006/gcen.1993.1050.
- Techa, S., Chung, J. S. 2013. 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. doi:10.1016/j.gene.2013.05.035.
- Techa, S., Chung, J. S. 2015. Ecdysteroids regulate the levels of molt-inhibiting hormone (MIH) expression in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Plos One*, v. 10, n. 4, e0117278. doi:10.1371/journal.pone.0117278.
- Termini, C. M., Gillette, J. M. 2017. Tetraspanins Function as Regulators of Cellular Signaling. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 5, n. 34. doi: 10.3389/fcell.2017.00034.
- Tian, Z., Kang, X., Mu, S. 2012. The molt stages and the hepatopancreas contents of lipids, glycogen and selected inorganic elements during the molt cycle of the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*. *Fisheries Science*, v. 78, pp. 67-74. doi: 10.1007/s12562-011-0426-8.
- Trapp, J., Almunia, C., Gaillard, J. C., Pible, O., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J. 2016. Proteogenomic insights into the core-proteome of female reproductive tissues from crustacean amphipods. *Journal of Proteomics*, v. 135, pp. 51-61. doi: 10.1016/j.jprot.2015.06.017.

- Trapp, J., Almunia, C., Gaillard, J. C., Pible, O., Chaumot, A., Geffard, O., Armengaud, J. 2015. Data for comparative proteomics of ovaries from five non-model, crustacean amphipods. *Data in Brief*, v. 5, pp. 1-6. doi: 10.1016/j.dib.2015.07.037.
- Trapp, J., Geffard, O., Imbert, G., Gaillard, J. C., Davin, A. H., Chaumot, A., Armengaud, J. 2014. Proteogenomics of *Gammarus fossarum* to document the reproductive system of amphipods. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 13, i. 12, pp. 3612-3625. doi: 10.1074/mcp.M114.038851.
- Truesdale, C. L., McManus, M. C., Collie, J. S. 2019. Growth and molting characteristics of Jonah crab (*Cancer borealis*) in Rhode Island Sound. *Fisheries Research*, v. 211, pp. 13-20. doi: 10.1016/j.fishres.2018.10.030.
- Varó, I., Prado-Álvarez, M., Ortea, I., Morales, A. E., García-Fernández, P., Domingues, P., Tur, R., Dios, S., Gestal, C. 2022. Proteogenomic study of the effect of an improved mixed diet of live preys on the aquaculture of *Octopus vulgaris* paralarvae. *Frontiers in Marine Science*, v. 8, 8117701. doi: 10.3389/fmars.2021.8117701.
- Vasudevan, S., Rajendran, S. 2021. Thermal stress induced hyperglycemia in the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. *Journal of Thermal Biology*, v. 100, 103076. doi: 10.1016/j.jtherbio.2021.103076.
- Vinutha, H. P., Poornima, B., Sagar, B. M. 2018. Detection of outliers using interquartile range technique from intrusion dataset. *Information and Decision Sciences. Advances in Intelligent Systems and Computing*, v. 701. doi: 10.1007/978-981-10-7563-6_53.
- Vogt, G. 1985. Histologie und cytologie der mitteldarmdrüse von *Penaeus monodon* (Decapoda). *Zoologischer Anzeiger*, v. 215, pp. 61-80.
- Vogt, G. 2019. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of Morphology*, v. 280, pp. 1405-1444. doi: 10.1002/jmor.21040.
- Vogt, G. 2021. Synthesis of digestive enzymes, food processing, and nutrient absorption in decapod crustaceans: a comparison to the mammalian model of digestion. *Zoology*, v. 147, 125945. doi: 10.1016/j.zool.2021.125945.
- Vogt, G., Quintio, E. T., Pascual, F. P. 1989. Interaction of the midgut gland and the ovary in vitellogenesis and consequences for the breeding success: a comparison of unablated and ablated spawners of *Penaeus monodon*. *Aquaculture - a biotechnology in progress. Proceedings of the International Conference Aquaculture Europe*, v. 1, pp. 581-592.
- Wainwright, G., Webster, S. G., Wilkinson, M. C., Chung, J. S., Rees, H. H. 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*.

- Involvement in multihormonal regulation of growth and reproduction. *Protein Chemistry and Structure*, v. 271, i. 22, pp. 12749-12754. doi: 0.1074/jbc.271.22.12749.
- Watling, L. 2013. Feeding and Digestive System. *Functional Morphology and Diversity*, pp. 237-260. doi: 10.1093/acprof:osobl/9780195398038.003.0008.
- Webster, S. G. 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *Journal of Experimental Biology*, v. 199, i. 7, pp. 1579–1585. doi: 10.1242/jeb.199.7.1579.
- Webster, S. G., Keller, R. 1986. Purification, characterisation and amino acid composition of the putative moult-inhibiting hormone (MIH) of *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Journal of Comparative Physiology*, v. 156, pp. 617-624. doi:10.1007/BF00692738.
- Wilder, M. N., Okumura, T., Ainda, K., Hanyu, I. 1990. Ecdysteroid fluctuations during embryogenesis in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *General and Comparative Endocrinology*, v. 80, i. 1, pp. 93-100. doi: 10.1016/0016-6480(90)90152-c.
- Wiśniewski, J. R. 2016. Quantitative evaluation of Filter Aided Sample Preparation (FASP) and multienzyme digestion FASP protocols. *Analytical Chemistry*, v. 88, i. 10, pp. 5438–5443. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00859.
- Wiśniewski, J. R., Zielinska, D. F., Mann, M. 2011. Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method. *Analytical Biochemistry*, v. 410, i. 2, pp. 307–309. doi: 10.1016/j.ab.2010.12.004.
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., Nagaraj, N., Mann, M. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Methods*, v. 6, i. 5, pp. 359–362. doi: 10.1038/nmeth.1322.
- Wittmann, A. C., Benrabaa, S. A. M., López-Cerón, D. A., Chang, E. S., Mykles, D. L. 2018. Effects of temperature on survival, moulting, and expression of neuropeptide and mTOR signalling genes in juvenile Dungeness crab (*Metacarcinus magister*). *Journal of Experimental Biology*, v. 221, jeb187492. doi:10.1242/jeb.187492.
- Worden, M. K., Clark, C. M., Conaway, M., Qadri, S. A. 2006. Temperature dependence of cardiac performance in the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 209, i. 6, pp. 1024–1034. doi: 10.1242/jeb.02082.
- Xue, S., Yang, W., Sun, J. 2013. Role of chymotrypsin-like serine proteinase in white spot syndrome virus infection in *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 34, i. 2, pp. 403-409. doi: 10.1016/j.fsi.2012.10.017.

- Yang, Y., Tian, J., Du, X., Hang, Y., Li, Y., Huang, Y., Jiang, Q., Zhao, Y. 2023. Effects of temperature on the growth parameters, hepatopancreas structures, antioxidant ability, and non-specific immunity of the crayfish, *Cherax destructor*. *Aquaculture International*, v. 31, pp. 349–365. doi: 10.1007/s10499-022-00980-x.
- Yildiz, H. Y., Benli, A. C. K. 2004. Nitrite toxicity to crayfish, *Astacus leptodactylus*, the effects of sublethal nitrite exposure on hemolymph nitrite, total hemocyte counts and hemolymph glucose. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 59, n. 3, pp. 370–375. doi: 10.1016/j.ecoenv.2003.07.007.
- Yu, F., Haynes, S. E., Nesvizhskii, A. I. 2021. IonQuant Enables Accurate and Sensitive Label-Free Quantification With FDR-Controlled Match-Between-Runs. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, v. 20, 100077. doi: 10.1016/j.mcpro.2021.100077.
- Yu, X. L., Chang, E. S., Mykles, D. L., 2002. Characterization of limb autotomy factor-proecdysis (LAFpro), isolated from limb regenerates, that suspends molting in the land crab *Gecarcinus lateralis*. *The Biological Bulletin*, v. 202, n. 3, pp. 204–212. doi:10.2307/1543470.
- Zanotto, F. P., Wheatly, M. G. 2002. Calcium balance in crustaceans: nutritional aspects and physiological regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A Molecular & Integrative Physiology*, v. 133, i 3, pp. 645-660. doi: 10.1016/s1095-6433(02)00202-7.
- Zeng, J., Nakatsuji, T., Roer, R. D., Watson, R. D. 2008. 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. doi: 10.1016/j.ygcen.2007.10.009.
- Zhai, B., Li, X., Lin, C., Yan, P., Zhao, Q., Li, E. 2021. Proteomic analysis of hemocyte reveals the immune regulatory mechanisms after the injection of corticosteroid-releasing hormone in mud crab *Scylla paramamosain*. *Journal of Proteomics*, v. 242, 104238. doi: 10.1016/j.jprot.2021.104238.
- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G. A., Ma, B. 2012. PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, v. 11, i. 4, M111.010587. doi: 10.1074/mcp.M111.010587.
- Zhang, Q., Wu, E., Tang, Y., Cai, T., Zhang, L., Wang, J., Hao, Y., Zhang, B., Zhou, Y., Guo, X., Luo, J., Chen, R., Yang, F. 2021. Deeply mining a universe of peptides encoded by long noncoding RNAs. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, v. 20, 100109. doi: 10.1016/j.mcpro.2021.100109.

- Zhang, X-Y., Zhang, M-Z., Zheng, C-J., Liu, J., Hu, H-J. 2009. Identification of two hsp90 genes from the marine crab, *Portunus trituberculatus* and their specific expression profiles under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 150, pp. 466-473. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.07.002.
- Zhu, T., Zhou, Q., Yang, Z., Zhang, Y., Luo, J., Xhang, X., Shen, Y., Jiao, L., Tocher, D. R., Jin, M. 2022. Dietary cholesterol promotes growth and ecdysone signalling pathway by modulating cholesterol transport in swimming crabs (*Portunus trituberculatus*). *Animal Nutrition*, v. 10, pp. 249-260. doi: 10.1016/j.aninu.2022.05.001.
- Zmora, N., Sagi, A., Zohar, Y., Chung, J. S. 2009b. 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. doi: 10.1186/1746-1448-5-6.
- Zmora, N., Trant, J., Zohar, Y., Chung, J. S. 2009a. 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. doi: 10.1186/1746-1448-5-7.