

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

DANIEL CASTRO MARTIGNAGO

**ESTABELECIMENTO DE MARCADORES FUNCIONAIS EM OÓCITOS DOS CORAIS  
*MUSSISMILIA HARTTHI* E *MUSSISMILIA BRAZILIENSIS***

Porto Alegre  
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA  
BIODIVERSIDADE**

**ESTABELECIMENTO DE MARCADORES FUNCIONAIS EM OÓCITOS DOS  
CORAIS *MUSSISMILIA HARTTII* E *MUSSISMILIA BRAZILIENSIS***

**Daniel Castro Martignago**  
**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Guendalina Turcato Oliveira**  
**Coorientador: Leandro Cesar de Godoy**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**  
**Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429**  
**Fone: (051) 320-3500**  
**CEP 90619-900 Porto Alegre - RS**  
**Brasil**

**2021**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA  
BIODIVERSIDADE**

**ESTABELECIMENTO DE MARCADORES FUNCIONAIS EM OÓCITOS DOS  
CORAIS *MUSSISMILIA HARTTII* E *MUSSISMILIA BRAZILIENSIS***

**Daniel Castro Martignago**  
**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Guendalina Turcato Oliveira**  
**Coorientador: Leandro Cesar de Godoy**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
PORTO ALEGRE – RS - BRASIL  
2021**

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	ii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	iii
<b>Agradecimentos</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vi
<b>1. Introdução</b> .....	9
<b>2. Métodos</b> .....	17
2.1 Local de coleta.....	17
2.2 Coleta dos oócitos.....	17
2.3 Análises bioquímicas.....	18
2.4 Análises estatísticas.....	20
<b>3. Resultados</b> .....	21
3.1 <i>Mussimilia harttii</i> .....	21
3.2 <i>Mussismilia braziliensis</i> .....	24
3.3 <i>Mussimilia harttii x Mussismilia braziliensis</i> .....	25
<b>4. Discussão</b> .....	27
4.1 <i>Mussimilia harttii</i> .....	27
4.2 <i>Mussismilia braziliensis</i> .....	32
4.3 <i>Mussimilia harttii x Mussismilia braziliensis</i> .....	33
<b>5. Conclusões</b> .....	35
<b>Referências</b> .....	36
<b>Apêndices</b> .....	45

## Lista de figuras

- Figura 1:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos da colônia totalmente branqueada de *Mussismilia harttii*.....22
- Figura 2:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos da colônia parcialmente branqueada de *Mussismilia harttii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .....23
- Figura 3:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos da saudável de *Mussismilia harttii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .....24
- Figura 4:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos de *Mussismilia braziliensis*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .....25
- Figura 5:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre cada colônia de *Mussismilia harttii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$  .....45
- Figura 6:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre os oócitos das duas espécies do gênero *Mussismilia*. Letras diferentes representam diferenças significativas para um  $p < 0,05$ .....46

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre cada colônia de *Mussismilia harttii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$

.....21

**Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre os oócitos das duas espécies do gênero *Mussismilia*. Letras diferentes representam diferenças significativas para um  $p < 0,05$ .....26

## **Agradecimentos**

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu pai Ernani e a minha mãe Bia, por sempre me apoiarem, estarem comigo quando preciso, me incentivarem e por transmitirem todos os seus valores e ensinamentos.

À minha noiva e melhor amiga, Larissa, por termos uma relação sólida que oferece todo o suporte, carinho, amor e paciência que preciso.

À minha querida orientadora, Guendalina Turcato, por abrir portas e me guiar quando mais precisei. Pela paciência, parceria e oportunidade. E por mergulhar nessa aventura.

Ao meu coorientador, Leandro Godoy, por ter me aceito ainda na graduação como bolsista e ter me apresentado a este mundo vibrante e incrível que é o dos corais.

Aos colegas de laboratório que me acolheram com muito carinho, mesmo tendo vindo de outra instituição. Por sempre estarem presentes na bancada, onde me ensinaram tudo para que este trabalho fosse realizado e pelas fofocas e risadas.

À equipe do Projeto Reefbank pela parceria em campo e pelo conhecimento dividido.

Ao Projeto Coral Vivo, que proporcionou toda a estrutura e as colônias para a realização, não só deste trabalho, como de outros que ainda estão gerando frutos.

Ao CNPq, pela bolsa e à FUNBIO e ao Boticário pelos financiamentos que permitiram nossa viagem, estadia e materiais necessários para realização deste trabalho.

## Resumo

Corais possuem uma relação de simbiose com zooxantelas, microalgas associadas ao tecido do animal, responsáveis pela maior parte de seu ganho energético diário. O aquecimento da água do oceano rompe a simbiose, fenômeno conhecido por branqueamento. Sem sua principal fonte nutricional, corais dependem da heterotrofia para sobreviver, o que pode levar a estagnação do ciclo reprodutivo. Há corais, porém, que conseguem manter a gametogênese mesmo quando branqueados, entretanto a fisiologia desses gametas em tal situação é desconhecida. Neste trabalho quantificamos e avaliamos o balanço oxidativo de oócitos liberados de colônias saudáveis de *Mussismilia braziliensis*; além de oócitos de três colônias de *Mussismilia harttii* com diferentes estados de saúde: uma branqueada, uma parcialmente branqueada e uma saudável. Comparamos também, o balanço oxidativo entre as colônias saudáveis das duas espécies. Os oócitos foram congelados ao longo de uma curva de tempo pós desova (0, 5 e 10 h) para avaliar o balanço oxidativo durante o tempo de vida celular e o esforço celular para se manter saudável. Mediram-se os níveis de proteínas totais, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e os níveis de lipoperoxidação (TBARS), um marcador de dano lipídico. Em *M. braziliensis* a atividade da SOD aumentou entre 5 e 10h pós desova, assim como a lipoperoxidação entre 0 e 10h. Ao se comparar os oócitos advindos de corais com diferentes estados de saúde em *M. harttii*, não foi encontrada diferença entre os parâmetros estudados durante o tempo pós desova, com exceção da SOD em 0h. Estes organismos parecem preservar a qualidade das células gaméticas femininas mesmo 10h pós desova. Esta resposta pode estar relacionada a intensificação da heterotrofia garantindo o aporte nutricional e assim, o esforço reprodutivo e a qualidade dos gametas mesmo em corais branqueados. Ao compararmos os parâmetros entre as colônias saudáveis das duas espécies verificamos que eles diferiram em todos os parâmetros analisados nas 5h pós desova e na SOD às 10h, evidenciando um padrão espécie-específico para estes biomarcadores.

**Palavras-chave:** Balanço oxidativo, espécies reativas de oxigênio, corais, gameta feminino.

## ESTABLISHMENT OF FUNCTIONAL BIOMARKERS IN OOCYTES OF THE

### *MUSSISMILIA HARTTII* AND *MUSSISMILIA BRAZILIENSIS* CORALS

#### Abstract

Corals have a symbiotic relationship with zooxanthellae, microalgae associated with the animal's tissue, responsible for most of its daily energy gain. Warming ocean water breaks symbiosis, a phenomenon known as bleaching. Without their main nutritional source, corals depend on heterotrophy to survive, which can lead to stagnation of the reproductive cycle. There are corals, however, that manage to maintain gametogenesis even when bleached, however the physiology of these gametes in such a situation is unknown. In this work, we quantify and evaluate the oxidative balance of oocytes released from healthy colonies of *Mussismilia braziliensis*; in addition to oocytes from three colonies of *Mussismilia harttii* with different health conditions: one bleached, one partially bleached and one healthy. We also compared the oxidative balance between healthy colonies of the two species. Oocytes were frozen along a post-spawning time curve (0, 5 and 10 h) to assess oxidative balance during cell life and cell effort to remain healthy. Total protein levels, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the levels of lipoperoxidation (TBARS), a marker of lipid damage, were measured. In *M. braziliensis*, SOD activity increased between 5 and 10h after spawning, as well as lipoperoxidation between 0 and 10h. When comparing the oocytes from corals with different health conditions in *M. harttii*, no difference was found between the parameters studied during the post-spawning time, except for SOD at 0h. These organisms seem to preserve the quality of female gametic cells even after 10 hours of spawning. This response may be related to the intensification of heterotrophy, ensuring nutritional support and thus reproductive effort and quality of gametes even in bleached corals. When comparing the parameters between the healthy colonies of the two species, we verified that they differed in all the parameters analyzed in the 5h post spawning and in the SOD at 10am, showing a species-specific pattern for these biomarkers.

**Keywords:** Oxidative balance, reactive oxygen species, corals, female gamete.

## 1. Introdução

Apesar de ocuparem menos de 1% de todo o fundo marinho, recifes de coral são ecossistemas tão biodiversos quanto as florestas tropicais. Os recifes são característicos de águas rasas e quentes dos trópicos e servem de berçário, abrigo e fonte nutricional para 25% das espécies marinhas (FISHER *et al.*, 2015).

Recifes de coral também têm importância econômica para o ser humano; resistem a ações mecânicas de ondas, impedindo que elas cheguem ao litoral; são fonte de pescado que serve de alimento e renda para milhares de comunidades ao redor do mundo, gerando uma renda aproximada de US\$ 352,000 por hectare por ano (COSTANZA *et al.*, 2014); além de fornecerem matéria-prima para o desenvolvimento de medicamentos (CASTRO; ZILBERBERG, 2016). Ainda que os recifes de coral sejam formados principalmente por corais; esponjas e algas também fazem parte de sua estrutura.

Corais são animais do filo Cnidaria, classe Anthozoa, subclasse Octocorallia (corais moles) e subclasse Hexacorallia (corais pétreos). Como característica do filo, os corais possuem apenas dois epitélios, o epitélio externo (epiderme) e o epitélio interno (gastroderme) e entre ambos, a mesoglêia. Possuem uma boca envolta por tentáculos, responsáveis por busca de alimentos, que abrem para a cavidade gastrovascular – responsável pela circulação de água e digestão do animal (RUPPERT; BARNES, 1996). A grande diferença entre as duas subclasses de corais é que os Octocorallia não depositam esqueleto, por isso o nome popular de corais moles, enquanto os Hexacorallia produzem e secretam esqueleto, por isso o nome popular de corais pétreos ou escleractíneos.

Os corais pétreos formam colônias; união de diversos pólipos (indivíduos de mesmo material genético) conectados por um tecido denominado cenossarco. São seres sésseis e heterótrofos, alguns associados com endossimbiontes autótrofos. O esqueleto secretado é formado por carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e é precipitado na forma do mineral aragonita, sendo a célula calicoblástica a responsável por sua produção e deposição (MARANGONI; MARQUES; BIANCHINI, 2016).

Esses cnidários vivem em conjunto com uma microbiota bastante diversa e específica, composta por microalgas, fungos, protozoários, bactérias, arqueias e vírus. Os simbiontes de corais mais conhecidos e estudados são as microalgas dinoflageladas do gênero *Symbiodinium*, conhecidas como zooxantelas. Essa relação permite ao recife de coral prosperar em ambientes com pouca oferta nutricional (oligotróficos) (GARRIDO;

PICCIANI; ZILBERBERG, 2016). Corais e zooxantelas têm uma relação mutualística íntima e dependente; o simbiote disponibiliza ao hospedeiro grande parte do carbono fixado pela fotossíntese, para nutrição e crescimento do coral, além de oxigênio e auxiliam na deposição do esqueleto de carbonato de cálcio (CASTRO; ZILBERBERG, 2016; YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008). Enquanto o hospedeiro disponibiliza elementos inorgânicos para a microalga, como carbono, fósforo e nitrogênio para a realização da fotossíntese, além de dar proteção contra predadores e um ambiente propício para seu ótimo fisiológico (WEIS, 2008; YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008).

As microalgas são encontradas na gastroderme do coral, em vacúolos denominados simbiossoma (MARANGONI; MARQUES; BIANCHINI, 2016; WEIS, 2008; YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008). O simbiossoma é formado por uma membrana produzida pelo hospedeiro e por outra derivada do simbiote, sendo a interface de troca de moléculas entre os dois organismos. As membranas do simbiossoma apresentam mecanismos de controle ativo, selecionando as moléculas cambiáveis (WEIS, 2008). Acredita-se que existam cerca de 160 espécies de Symbiodinium diferentes. Apesar dessa diversidade, corais e simbiossomas possuem uma relação de fidelidade, na qual a grande maioria das microalgas associadas pertence a uma espécie, tendo apenas presenças vestigiais de outras comunidades de dinoflagelados (LAJEUNESSE *et al.*, 2004; YELLOWLEES; REES; LEGGAT, 2008).

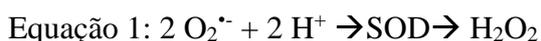
Um problema conhecido há décadas está, agora, tomando proporções alarmantes, o branqueamento de corais. Esse fenômeno se dá pela expulsão das microalgas simbiossomas do tecido dos corais, sendo este processo provocado pelo excesso da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (WEIS, 2008). Como os simbiossomas são responsáveis pela coloração do coral, quando expulsos, deixam seu esqueleto branco à mostra, dando ao fenômeno o nome de branqueamento. Espécies reativas de oxigênio são moléculas instáveis e extremamente reativas capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. Devido a sua carga iônica as EROs são agentes redutores, ou seja, têm a capacidade de reduzir outras moléculas, doando-as elétrons. A geração de espécies reativas de oxigênio acontece em todos os seres vivos por processos celulares fisiológicos, ocorrendo principalmente na mitocôndria via fosforilação oxidativa, na Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE). A CTE é composta por cinco complexos (I-V) e faz parte do processo de respiração celular, onde substratos como a glicose, ácidos graxos e aminoácidos são clivados gerando energia na forma de ATP, liberando também

água e CO<sub>2</sub>. Em homeostase, o oxigênio é convertido em água no complexo IV, entretanto, de 2% a 5% desse oxigênio não é reduzido completamente levando assim a formação de EROs (ANDRADE; SENEDA; ALFIERI, 2010; BARBOSA *et al.*, 2010; DOWLING; SIMMONS, 2009).

As EROs, também chamadas de pró-oxidantes, podem ser moléculas radicais e não- radicais. As espécies radicais são conhecidas como radicais livres, pois são moléculas eletroquimicamente instáveis e altamente reativas por apresentarem um elétron desemparelhado em seu último orbital (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005); enquanto as espécies não- radicais são mais estáveis por possuírem seus elétrons emparelhados (MARTELLI; NUNES, 2014). Os principais tipos de EROs produzidos são: o Ânion Radical Superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o Radical Hidroxila (OH<sup>•</sup>).

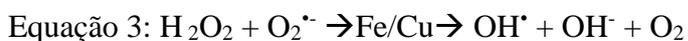
O ânion superóxido é formado pela redução incompleta do oxigênio molecular pela adição de um elétron, principalmente na CTE. Esse radical é inativo, porém seu potencial de agir como oxidante e redutor pode levar ao rompimento homeostático celular, devido a sua capacidade de gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH<sup>•</sup> (ANDRADE; SENEDA; ALFIERI, 2010; BARREIROS; DAVID, 2006).

O peróxido de hidrogênio se forma principalmente pela dismutação do superóxido, reação catalisada pela Superóxido Dismutase (SOD) (Equação 1), como também, no catabolismo de aminoácidos e oxidação de ácidos graxos. Apesar de ser uma espécie reativa, não é um radical, ou seja, não possui um elétron desemparelhado. Essa singularidade permite que esta molécula atravesse facilmente as membranas do interior da célula através das aquaporinas (canais proteicos nas membranas que facilitam a entrada e a saída de água). Assim como o superóxido, tem a capacidade de romper a homeostase celular pela geração de radical hidroxila (OH<sup>•</sup>) (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID, 2006).



O OH<sup>•</sup> é formado, como dito anteriormente, pela transformação das outras duas EROs. Isso se deve a participação de íons metálicos de ferro e cobre em reações redox (redução-oxidação), como as de Fenton e Haber-Weiss (Equações 2 e 3) (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID, 2006). É considerado a ERO mais reativa e capaz de

causar danos ao sistema celular e, uma vez formada, não é reduzida a formas menos letais por nenhum mecanismo conhecido.

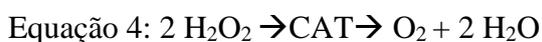


Apesar das EROs estarem comumente associadas ao Estresse Oxidativo e a danos celulares, elas têm um importante papel fisiológico nos organismos. Quando em quantidades normais, tanto em plantas quanto em animais, as EROs participam da regulação da expressão gênica via processos redox (BARREIROS; DAVID, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2005), sinalização celular (MARTELLI; NUNES, 2014; SCHIEBER; CHANDEL, 2014), processo inflamatório e sistema imune (DOWLING; SIMMONS, 2009; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; SHADEL; HORVATH, 2015), saciedade e exercícios (SHADEL; HORVATH, 2015), crescimento e tempo de vida (DOWLING; SIMMONS, 2009; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; SHADEL; HORVATH, 2015), maturação de gametas e fertilização (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; BARREIROS; DAVID, 2006), saída da dormência e germinação de sementes (DOWLING; SIMMONS, 2009), entre outros.

Para manter o equilíbrio fisiológico, os diferentes grupos de seres vivos possuem um sistema de defesa antioxidante que atua contra as EROs. Esse sistema é composto por moléculas chamadas antioxidantes, que têm como funções retardar, prevenir ou remover o dano oxidativo, transformando as EROs em moléculas menos instáveis e/ou lesivas como a água (H<sub>2</sub>O). Seus níveis e a composição diferem de acordo com o tecido e a célula. Há dois tipos de defesas antioxidantes, a enzimática e a não enzimática (BARBOSA *et al.*, 2010). As defesas enzimáticas são produzidas no próprio organismo e compostas por proteínas com capacidades catalizadoras. Seus principais componentes são a Superóxido Dismutase (SOD), a Catalase (CAT), a Glutathione Peroxidase (GPx) e a Glutathione Redutase (Gr), as quais atuam prevenindo e controlando a formação de EROs. Neste estudo daremos ênfase a SOD e a CAT.

A superóxido dismutase é responsável pela dismutação do O<sub>2</sub><sup>•-</sup> em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, conforme mostrado na Equação 1. A SOD catalisa essa transformação, que pode ocorrer naturalmente. Dependendo do local em que atua, utiliza-se de cofatores diferentes para suas reações; no citoplasma depende de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn) e na mitocôndria depende de manganês (SOD-Mn) (BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID,

2006). A catalase, por sua vez converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Equação 4) (BARREIROS; DAVID, 2006). Seus sítios ativos são compostos pelo grupamento Fe<sup>3+</sup>-heme.



As defesas antioxidantes não-enzimáticas são constituídas por moléculas de baixo peso molecular de origem endógena e exógena ao organismo. Em sua maioria, são adquiridas através da alimentação de origem animal e vegetal, destacando-se vitaminas (ácido ascórbico, tocoferol, betacaroteno), minerais (cobre, zinco, selênio, magnésio) e fenólicos (flavonoides), taurinas e carotenos, entre outras. Já as ubiquinonas, o ácido úrico, a glutathione e a melatonina são sintetizadas no próprio organismo. Estas moléculas atuam como antioxidantes através da proteção de biomoléculas, remoção do agente pró-oxidante e/ou reparação de danos moleculares (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005).

Fatores exógenos estressantes, como fotoperíodo, pH, falta de alimento, patógenos, entre outros, podem gerar um desequilíbrio fisiológico na razão pró-oxidantes e antioxidantes nos organismos. Uma vez que a homeostase é rompida e tende ao lado da maior geração de EROs, o organismo fica sujeito a patologias oriundas do estresse oxidativo. Sabe-se que o radical hidroxila interage com: os ácidos nucleicos (ADN e ARN) desestruturando-os por modificação nas purinas, pirimidinas e desoxirriboses; os lipídios poliinsaturados, presentes principalmente nas membranas, conduzindo a uma série de reações em cadeia, constituída por três etapas (iniciação, propagação e terminação), gerando subprodutos que alteram a permeabilidade, a fluidez e a integridade das mesmas; as proteínas, desnaturando-as, ou seja, fazendo-as perderem sua forma e funções (proteínas carboniladas) e com os carboidratos, fatores que podem levar a morte celular (ANDRADE; SENEDA; ALFIERI, 2010; BARBOSA *et al.*, 2010; BARREIROS; DAVID, 2006). Essas pequenas alterações estruturais e fisiológicas podem levar a sérias patologias como lesões no material genético que causam o surgimento de tumores e câncer (MARTELLI; NUNES, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2005; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013); doenças neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer (MARTELLI; NUNES, 2014; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013); infertilidade masculina e feminina (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; MARTELLI; NUNES, 2014); diabetes e doenças cardiovasculares (MARTELLI; NUNES, 2014; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013); mudanças iônicas que afetam o metabolismo e potencial elétrico (DEMIDCHIK,

2015) e o branqueamento em corais (BAIRD; GUEST; WILLIS, 2009; WEIS, 2008), por exemplo.

O estresse oxidativo em corais tem sido associado ao aquecimento global. Elevados níveis de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) atmosférico são dissociados em carbono inorgânico no oceano, o que reduz seu pH. O íon carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), essencial para a formação dos esqueletos dos corais fica indisponível em níveis mais baixos de pH, impedindo seu crescimento (COHEN; HOLCOMB, 2009). Outro problema são as elevadas temperaturas e a maior incidência solar que incitam uma maior produção fotossintética dos simbiontes, gerando mais EROs que atravessam o simbiossoma e chegam ao tecido do hospedeiro (HOEGH-GULDBERG, 1999; MARANGONI; MARQUES; BIANCHINI, 2016; TCHERNOV *et al.*, 2011).

O holobionte, entretanto, desenvolveu estratégias para evitar o estresse oxidativo ou corrigir seu dano, como: pigmentos fluorescentes que protegem tecidos vulneráveis a dano por radiação (SALIH; HOEGH-GULDBERG; COX, 1998); aminoácidos semelhantes à micosporina que absorvem e dissipam energia UV (SHICK; DUNLAP, 2002); proteínas de choque térmico, que mantêm a estrutura e a fisiologia celular (BROWN *et al.*, 2002) e o sistema antioxidante (BAIRD; GUEST; WILLIS, 2009). Quando esses sistemas de defesa não funcionam, o coral acaba por expulsar as zooxantelas na sua última tentativa de voltarem a homeostase (TCHERNOV *et al.*, 2011).

Já foram descritos eventos mundiais de branqueamento de recifes de coral desde 1998. Esses eventos estão relacionados às mudanças climáticas trazidas com o *El Niño* (EAKIN *et al.*, 2017). O evento global de branqueamento mais catastrófico ocorreu por três anos consecutivos (2014-2017), onde 75% dos recifes tropicais experienciaram branqueamento, com mortalidade de 30% (EAKIN *et al.*, 2017; SKIRVING *et al.*, 2019), com locais onde 98% dos corais branquearam. No Brasil, eventos de branqueamento vêm sendo observados ao longo da costa: na Bahia (CASTRO; PIRES, 1999) e no Ceará (SOARES; RABELO, 2014). Porém, pouco se sabe sobre como o branqueamento afeta a biologia reprodutiva dos corais.

Esse grupo de cnidários possui reprodução tanto assexuada quanto sexuada (FAUTIN, 2002). Na reprodução assexuada há a geração de um novo indivíduo com a mesma carga genética do seu original. As formas mais conhecidas são o brotamento de um pólipó que se solta da colônia ou por fragmentação da colônia (PIRES *et al.*, 2016).

Já a reprodução sexuada, por sua vez, tem a combinação gênica pela produção de gametas. Nos corais não há um tecido específico para as gônadas, sendo as células sexuais geradas no mesentério dos pólipos. A colônia pode ser fêmea ou macho (dioico) ou pode ser hermafrodita (monóico), neste caso seus pólipos podem ser dioicos ou monóicos (PIRES *et al.*, 2016).

Seu ciclo de vida passa por duas fases distintas: a de pólipo livre-natante e a de colônia sésil (PIRES *et al.*, 2016). Há espécies chamadas de incubadoras, que apenas liberam espermatozoides na coluna da água e realizam a fecundação internamente, tendo todo o desenvolvimento da plânula dentro dos pólipos. Ao serem liberadas, as plânulas já apresentam zooxantelas. E há espécies chamadas liberadoras que liberam ambos os gametas e a fecundação se dá na coluna da água. Após a embriogênese é que as plânulas adquirem zooxantelas da coluna da água (FAUTIN, 2002; PIRES *et al.*, 2016).

Com a perda das zooxantelas, os corais buscam principalmente por zooplânctons na coluna da água com seus tentáculos (HOULBRÈQUE; FERRIER-PAGÈS, 2009) e conseguem manter elevados níveis de ácidos-graxos provenientes da heterotrofia para sua sobrevivência (MIES *et al.*, 2018). Algumas espécies de corais em estado de branqueamento têm redução na quantidade de pólipos em gametogênese e seus gametas são menores e de menor qualidade, chegando a ser inviáveis para reprodução (MENDES; WOODLEY, 2002; MICHALEK-WAGNER; WILLIS, 2001; WARD; HARRISON; HOEGH-GULDBERG, 2000). Em Okinawa, no Japão, após evento de branqueamento em 1998, constatou-se que as taxas de fecundidade caíram de 94% pré-branqueamento para 42% pós-branqueamento, devido à redução de motilidade espermática (OMORI *et al.*, 2001). Na última década, entretanto, constatou-se que corais que passaram por eventos de branqueamento seguidos e estavam branqueados durante a gametogênese, adquiriram a habilidade de manter a qualidade de seus gametas em nível similar aos de colônias saudáveis (ARMOZA-ZVULONI *et al.*, 2011; COX, 2007; FISHER *et al.*, 2015; JOHNSTON *et al.*, 2020; LEVITAN *et al.*, 2014).

Corais do gênero *Mussismilia* são hermafroditas e liberadores de gameta. No mesentério de seus pólipos são encontradas gônadas masculinas e femininas, sendo ambos gametas lançados dentro de um pacote mucoso que se dissolve na coluna da água. A oogênese no gênero *Mussismilia* tem duração de 11 meses, enquanto a espermatogênese inicia apenas três meses antes da desova (PIRES *et al.*, 2016; PIRES;

CASTRO; RATTO, 1999). Manter a gametogênese sem as zooxantelas é um desafio para o coral, pois a reprodução demanda grande aporte energético.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar o balanço oxidativo de oócitos dos corais *Mussismilia harttii* e *Mussismilia braziliensis*, o coral couve-flor e coral cérebro da Bahia, respectivamente. Ambas as espécies são endêmicas da costa brasileira, sendo a primeira, ameaçada de extinção. Para *M. harttii*, também, avaliou-se o balanço oxidativo dos oócitos de colônias com diferentes estados de saúde no momento da desova: uma branqueada, uma parcialmente branqueada e uma saudável. Estabelecer valores para o balanço oxidativo em oócitos de corais em temperatura ambiente pode permitir o desenvolvimento de estudos relacionando o uso destes marcadores e o sucesso de manutenção destes corais em situações de aumento da temperatura oceânica.

## 2. Métodos

### 2.1 Local de coleta

O Parque Municipal Marinho do Recife de Fora se localiza ao sul do estado da Bahia (BA), no município de Porto Seguro, a cinco milhas náuticas da costa (16°24'12.2"S 38°58'55.3"O). Foi criado em 1997 com o objetivo de ser área recreacional, assim como de educação e pesquisa. Possui uma área de 17,5km<sup>2</sup>, incluindo os arredores do recife. O Parque abriga toda a fauna de corais brasileiros conhecidos, incluindo os corais do gênero *Mussismilia*.

### 2.2 Coleta dos oócitos

Corais do gênero *Mussismilia* possuem desova anual, sendo a desova da espécie *M. harttii* entre os meses de setembro e novembro, e a de *M. braziliensis* em fevereiro (PIRES *et al.*, 2016). Como suas desovas são ditadas pela lua nova, cerca de duas semanas antes da fase da lua, mergulhadores do Projeto Coral Vivo retiraram colônias branqueadas, parcialmente branqueadas e saudáveis de *M. harttii* e saudáveis de *M. braziliensis* do recife. Após a coleta, os corais foram distribuídos em tanques de 1000 L, na Base de Pesquisa do Coral Vivo, no Eco Parque de Arraial d'Ajuda (BA). Os tanques possuem um sistema de água marinha circulante para simular a corrente da água e evitar estresse. A desova dos pacotes de gametas de *M. harttii* ocorreu entre os dias 28 e 30 de setembro de 2019, e de *M. braziliensis* no dia 22 de fevereiro de 2020. Todas as coletas, o transporte e protocolos foram aprovados pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, sob número 63368-3.

A desova teve início ao anoitecer, para *M. harttii* foram coletados gametas femininos de três colônias diferentes: uma totalmente branqueada, uma parcialmente branqueada e outra saudável. De cada colônia, foram coletados 5 pacotes de gametas. Enquanto para *M. braziliensis* foram coletados gametas femininos de diversas colônias saudáveis e realizado um *pool*. Em ambos os momentos, se acondicionaram os pacotes em tubos Falcon de 50 mL, já preenchidos com 30 mL da água do tanque onde os animais foram mantidos. Ao se romper, o pacote libera os gametas, sendo que os espermatozoides e os oócitos se separam devido à diferença de densidade na água, onde os oócitos flutuam e os espermatozoides afundam (PADILLA-GAMIÑO *et al.*, 2011). Os oócitos foram

realocados com uma pipeta de 100 µl em três tubos eppendorfs e, com uma pipeta Pasteur de 1 mL, em dois tubos Falcon (15 mL), com 5mL de Água Marinha Filtrada (AMF).

Para verificar o balanço oxidativo dos oócitos pós desova, os gametas foram congelados em nitrogênio líquido, por 5 min, a cada 5 h. Para o tempo zero hora, armazenou-se 30 µl de oócitos em três tubos do tipo eppendorf (10 µl cada) com o mínimo de AMF. Os tubos Falcon (15mL) permaneceram em aquários à 27,9°C (temperatura média anual no Recife de Fora) até cinco e dez horas pós desova, onde novamente foram retirados 30 µl de oócitos de cada tubo e dispostos em três tubos do tipo eppendorf (10 µl cada). Em seguida, todos eppendorfs foram congelados e mantidos em freezer a -80°C.

### *2.3 Análises Bioquímicas*

As amostras foram transportadas em gelo seco para à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), onde foram armazenadas a -80°C até a análise das amostras.

Após descongelados a temperatura ambiente, os oócitos em cada eppendorf foram diluídos 94 vezes em uma solução tampão de fosfato (20 mM) acrescida de cloreto de potássio (140 mM) e um inibidor de proteases, o PMSF (fluoreto de fenilmetil sulfonil fluoride, 1 mM em concentração final), em uma proporção de 1mL de solução para cada 10 µL de PMSF), totalizando um volume de 930 µl de homogeneizado. Em seguida, as amostras foram misturadas por 30 segundos em vórtex e centrifugadas em uma centrifuga refrigerada (SORVALL RC-5B), a 4°C, a 10.000 rpm por 10 min.

As proteínas totais disponíveis no sobrenadante obtido após a centrifugação foram usadas para calcular a oferta de proteínas para a quantificação dos marcadores de balanço oxidativo, a atividade das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) e os níveis de Lipoperoxidação (LPO), um marcador de dano oxidativo. Para a quantificação proteica e de dano foi realizada apenas a centrifugação do preparo do homogeneizado e utilizado o sobrenadante. Para a análise das enzimas de defesa, foi feita uma segunda centrifugação também a 4°C, em 10.000 rpm por 10 min., e utilizado o sobrenadante.

A dosagem de proteínas totais foi feita com o Kit comercial para a quantificação de Proteína Total da Biotécnica. A quantidade de proteína disponível por colônia/amostra

foi utilizada para a normatização dos níveis de defesa antioxidante e dano por lipoperoxidação. A concentração de proteína total é expressa em  $\text{mg mL}^{-1}$ .

A lipoperoxidação (LPO) representa o dano sofrido pela oxidação dos lipídios celulares, principalmente os de membranas. Uma das técnicas utilizada para a medida da LPO se utiliza da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para a realização da análise se mistura 150  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, 100  $\mu\text{l}$  de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% e 50  $\mu\text{l}$  de água destilada à 50  $\mu\text{l}$  da amostra. Os eppendorfs são, então, postos no banho-maria à 100°C por 15 min. Depois, são resfriados em banho de gelo por 10 min, após, adiciona-se 300  $\mu\text{l}$  de álcool n-butílico. Os eppendorfs, por último, são centrifugados a 4°C, em 3.000 rpm por 10 min. Pega-se 200  $\mu\text{l}$  do sobrenadante para leitura em um espectrofotômetro (CARY 3E–UV–Visible Spectrophotometer Varian), em um comprimento de onda de 535nm (BUEGE; AUST, 1978). A concentração de TBARS é expressa em nmoles de TBARS.mg de proteínas<sup>-1</sup>.

A Superóxido Dismutase (SOD) catalisa a transformação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, reduzindo a proporção de espécies de oxigênio reativas. Ao analisar a SOD, mede-se a quantidade da enzima que inibe em 50% a velocidade de redução do detector (epinefrina), em um meio de reação. O resultado da oxidação da epinefrina é o adrenocromo, que é lido no comprimento de onda de 480nm. O tampão SOD é constituído de 0,75 g de glicina, diluída em 200 mL de água Milli-Q. O tampão tem pH 11 e foi mantido a 30°C. O reagente SOD é constituído por 0,04 g de epinefrina, 14  $\mu\text{l}$  de ácido clorídrico e 2 mL de tampão SOD e mantido protegido da luz sob banho de gelo (BOVERIS; CADENAS, 1982). Para dosagem da amostra se faz uma curva de quantificação, onde no primeiro ponto se adicionou 435  $\mu\text{l}$  de tampão SOD, 15  $\mu\text{l}$  de amostra, no segundo ponto 430  $\mu\text{l}$  de tampão SOD, 20  $\mu\text{l}$  de amostra e no terceiro ponto 425  $\mu\text{l}$  de tampão SOD, 25  $\mu\text{l}$  de amostra. Para todos os pontos foi adicionado 17  $\mu\text{l}$  do reagente SOD. Estas foram lidas durante um período total de 1 min, sendo registrada a leitura em intervalos de tempo pré-estabelecidos (6 seg). A concentração de SOD é expressa em Unidade (U) de SOD por mg de proteínas<sup>-1</sup>.

A Catalase (CAT) catalisa a transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, evitando que o peróxido de hidrogênio se transforme em radical hidroxila. A atividade desta enzima é quantificada através do consumo do peróxido de hidrogênio. O comportamento de cinética enzimática é determinado pela inclinação negativa (diminuição da absorbância) em um comprimento de onda de 240nm. O tampão CAT é

constituído de 0,899 g de fosfato monobásico a 1 mM e 1,065 g de fosfato bibásico, também a 1 mM, diluídos em 150 mL de água Milli-Q. O tampão tem pH de 7,4 e foi mantido a 30°C. O reagente CAT é constituído por 146 µl de peróxido de hidrogênio diluído em 5 mL de tampão CAT e mantido abrigado da luz em banho de gelo (BOVERIS; CHANCE, 1973). Para a dosagem da amostra se adicionou 473 mL de tampão CAT, 10 µl de amostra e 17 µl do reagente CAT. Os resultados obtidos para catalase são expressos em nmoles de peróxido de hidrogênio consumido por min<sup>-1</sup> por mg de proteínas<sup>-1</sup>.

#### 2.4 Análise estatística

Para verificar a normalidade dos parâmetros se realizou o teste de Shapiro-Wilk, sendo também verificada a homogeneidade dos dados através do teste de Bartlett. Para *M. hartii*, comparou-se os parâmetros do balanço oxidativo entre os oócitos de cada colônia, nos três momentos pós desova (0, 5 e 10h) e entre os três momentos, nos oócitos de cada colônia. Enquanto para *M. braziliensis*, comparam-se os momentos pós desova dos oócitos. Comparou-se também o balanço oxidativo dos oócitos de colônias saudáveis de *M. braziliensis* com os de *M. hartii*. Utilizou-se uma análise de variância de uma via (ANOVA) com teste complementar de Tukey quando a distribuição dos dados foi normal e de Kruskal-Wallis, quando a distribuição foi não-paramétrica. O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ) e o programa utilizado foi o *R versão 3.4.0* (Microsoft R Open 3.4.0). Os valores são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3. Resultados

#### 3.1 *Mussismilia harttii*

Para a espécie *Mussismilia harttii* se comparou os resultados dos biomarcadores obtidos para os oócitos advindos de colônias com diferentes estados de saúde (saudável, parcialmente branqueada e totalmente branqueada), durante o período da desova e ao longo do tempo pós desova.

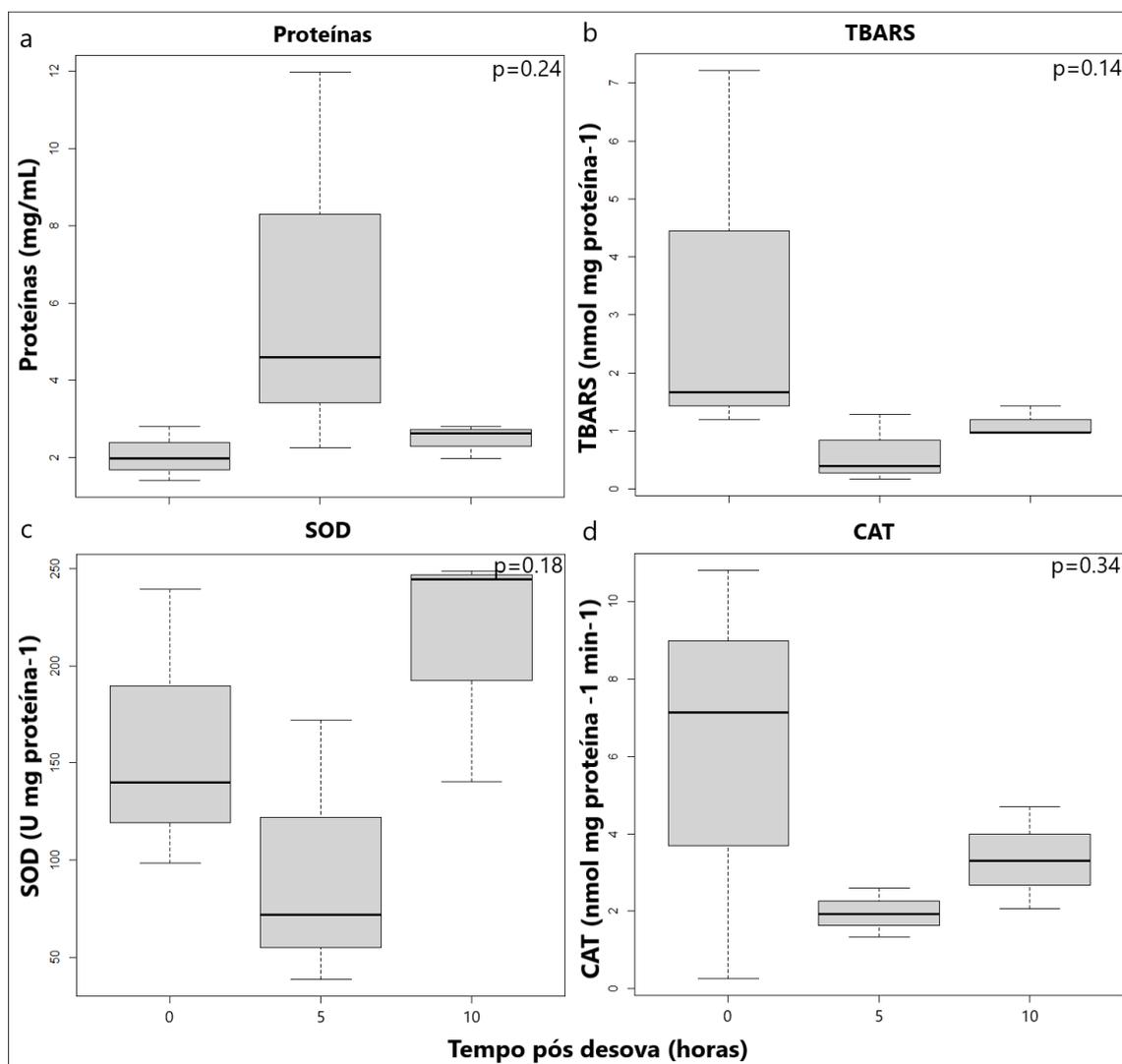
Os níveis de proteínas totais, lipoperoxidação (TBARS) e de atividade da catalase (CAT) não apresentaram diferenças significativas entre os oócitos advindos de colônias com diferentes estados de saúde no momento da desova (Tabela 1). Apenas a enzima Superóxido Dismutase (SOD) apresentou menor atividade no tempo 0h pós desova entre os oócitos da colônia totalmente branqueada com os oócitos das colônias parcialmente branqueada e saudável. Nos outros dois momentos em que se mediu a SOD (5h e 10h), não foi constatada diferença entre os oócitos das três colônias (Tabela 1).

**Tabela 1:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre cada colônia de *Mussismilia harttii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .

	<b>Totalmente Branqueada</b>	<b>Parcialmente Branqueada</b>	<b>Saudável</b>	<b>Valor-p</b>
<b>Proteína 0h</b>	2.06±0.72	1.40±0.49	1.76±0.61	0.46
<b>Proteína 5h</b>	6.27±3.06	7.83±3.81	9.83±4.80	0.56
<b>Proteína 10h</b>	2.47±1.38	3.56±1.99	5.46±3.06	0.30
<b>TBARS 0h</b>	3.36±2.77	2.14±1.77	1.88±1.55	0.65
<b>TBARS 5h</b>	0.62±0.49	0.42±0.34	0.31±0.25	0.60
<b>TBARS 10h</b>	1.12±0.67	0.79±0.477	0.89±0.53	0.77
<b>SOD 0h</b>	159.16 ±50.51 <sup>a</sup>	472.54 ±149.98 <sup>b</sup>	538.97 ±171.06 <sup>b</sup>	0.02*
<b>SOD 5h</b>	94.07±69.41	91.92±67.82	54.68±40.34	0.67
<b>SOD 10h</b>	211.27±151.98	193.09±138.90	195.82±140.87	0.98
<b>CAT 0h</b>	6.07±4.47	15.48±11.42	16.59±12.23	0.38
<b>CAT 5h</b>	1.96±0.87	3.01±1.33	1.30±0.57	0.15
<b>CAT 10h</b>	3.35±3.12	4.61±4.30	4.57±4.25	0.90

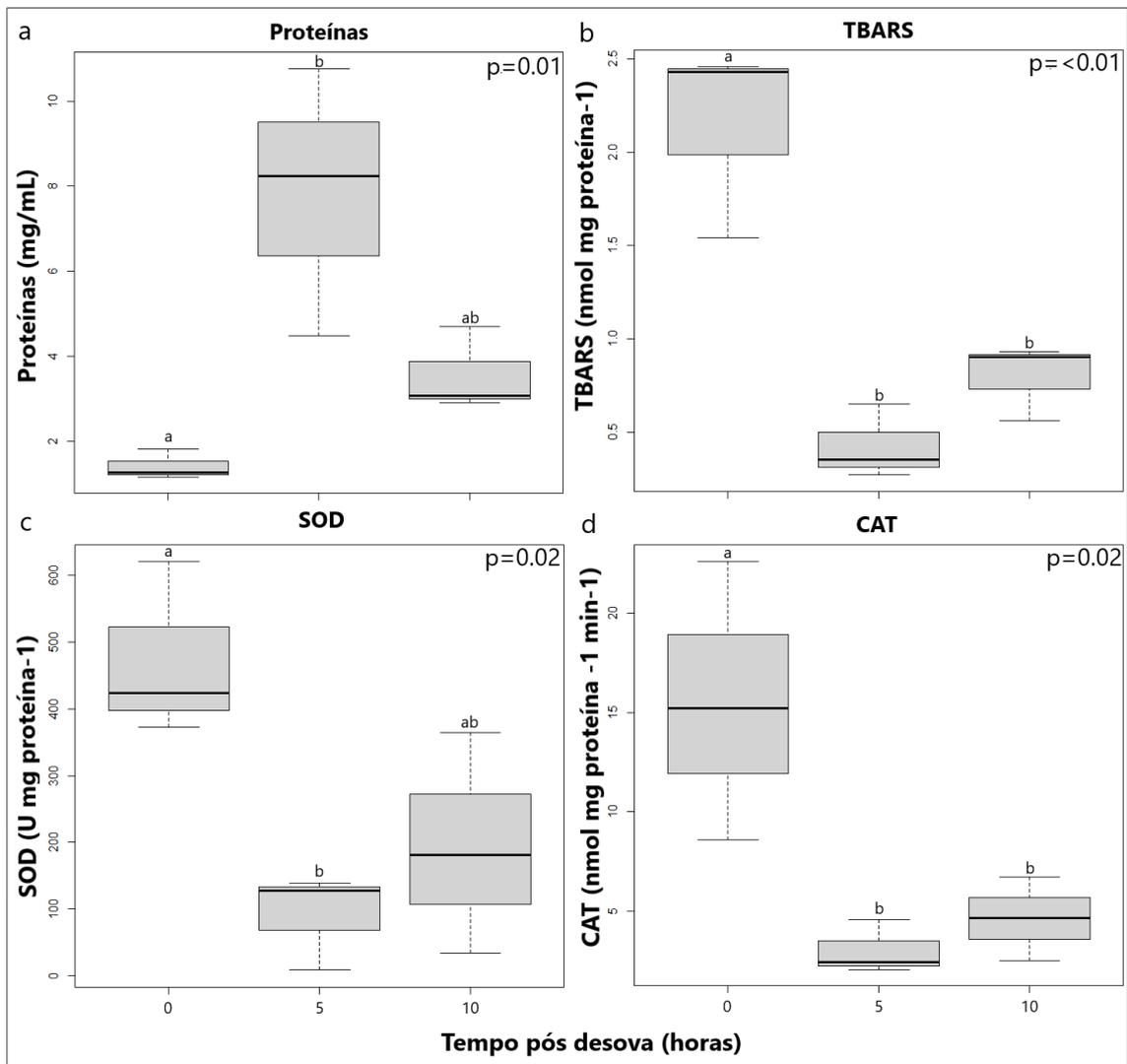
Proteína: mg mL<sup>-1</sup>; Lipoperoxidação (TBARS): nmol mg proteína<sup>-1</sup>; Superóxido dismutase (SOD): U mg proteína<sup>-1</sup>; Catalase (CAT): nmol mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

Quando se comparou os marcadores bioquímicos dos oócitos na colônia totalmente branqueada ao longo do tempo pós desova estes não apresentaram diferenças significativas na colônia totalmente branqueada (Figura 1).



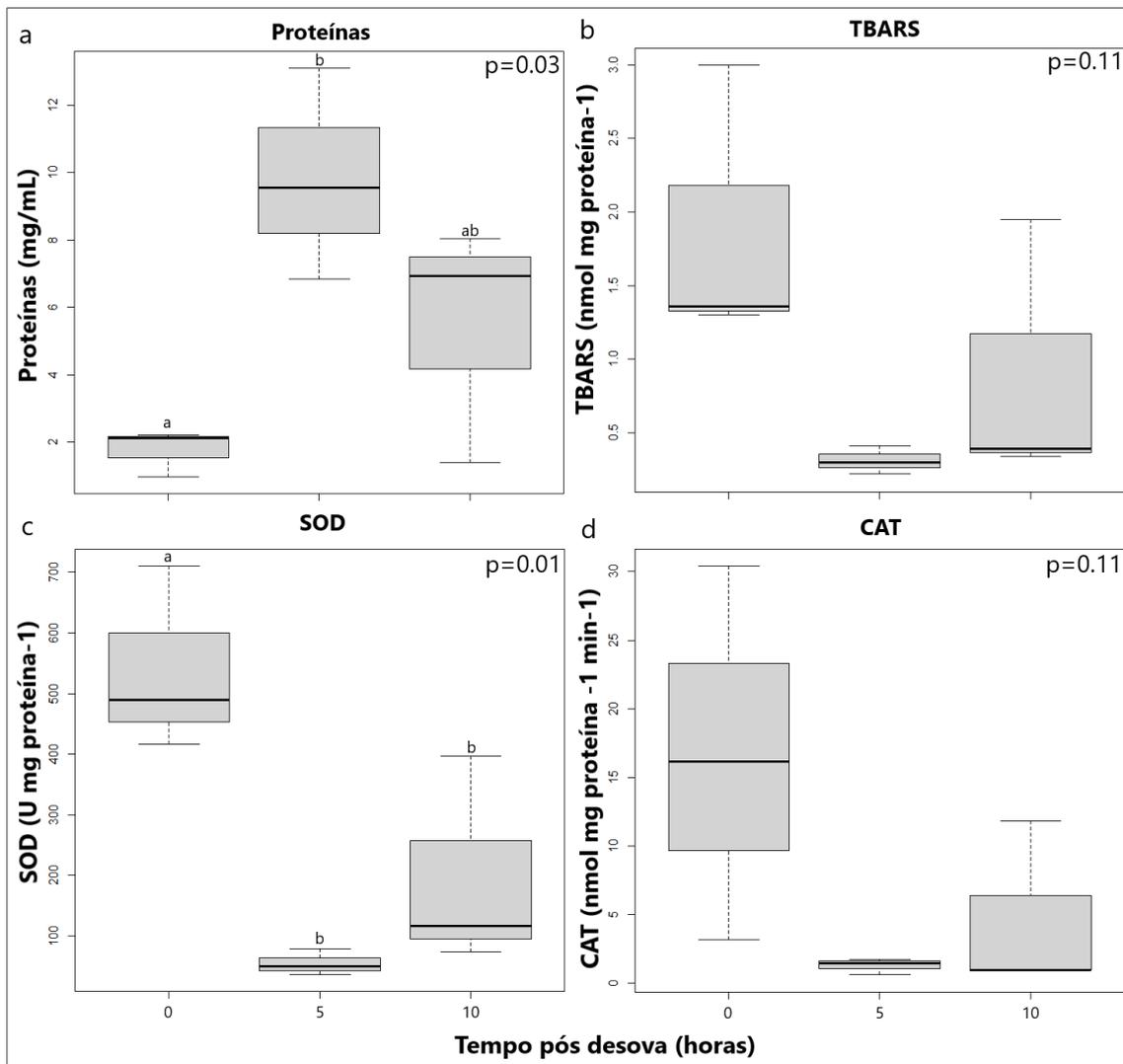
**Fig. 1:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos da colônia totalmente branqueada de *Mussismilia hartii*.

Para os oócitos da colônia parcialmente branqueada, todos os parâmetros analisados diferiram ao longo do tempo pós desova. Entre 0 e 5h pós desova observamos uma diminuição dos níveis de TBARS e de atividade da SOD e da CAT, enquanto a concentração de proteínas totais aumentou neste período. No período entre 5h e 10h pós desova, verificamos uma tendência de aumento da atividade da SOD, apesar desta não ser significativa, enquanto as proteínas totais diminuíram e os níveis de TBARS e CAT se mantiveram baixos (Figura 2).



**Fig. 2:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos da colônia parcialmente branqueada de *Mussismilia hartii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .

Para a colônia saudável, os parâmetros que diferenciaram foram as proteínas totais e a SOD. Para a primeira, houve um aumento entre 0h e 5h pós desova seguida de uma diminuição às 5h até às 10h; a SOD também diminuiu sua atividade às 5h apresentando a seguir, um aumento não significativo de sua atividade às 10h pós desova (Figura 3).

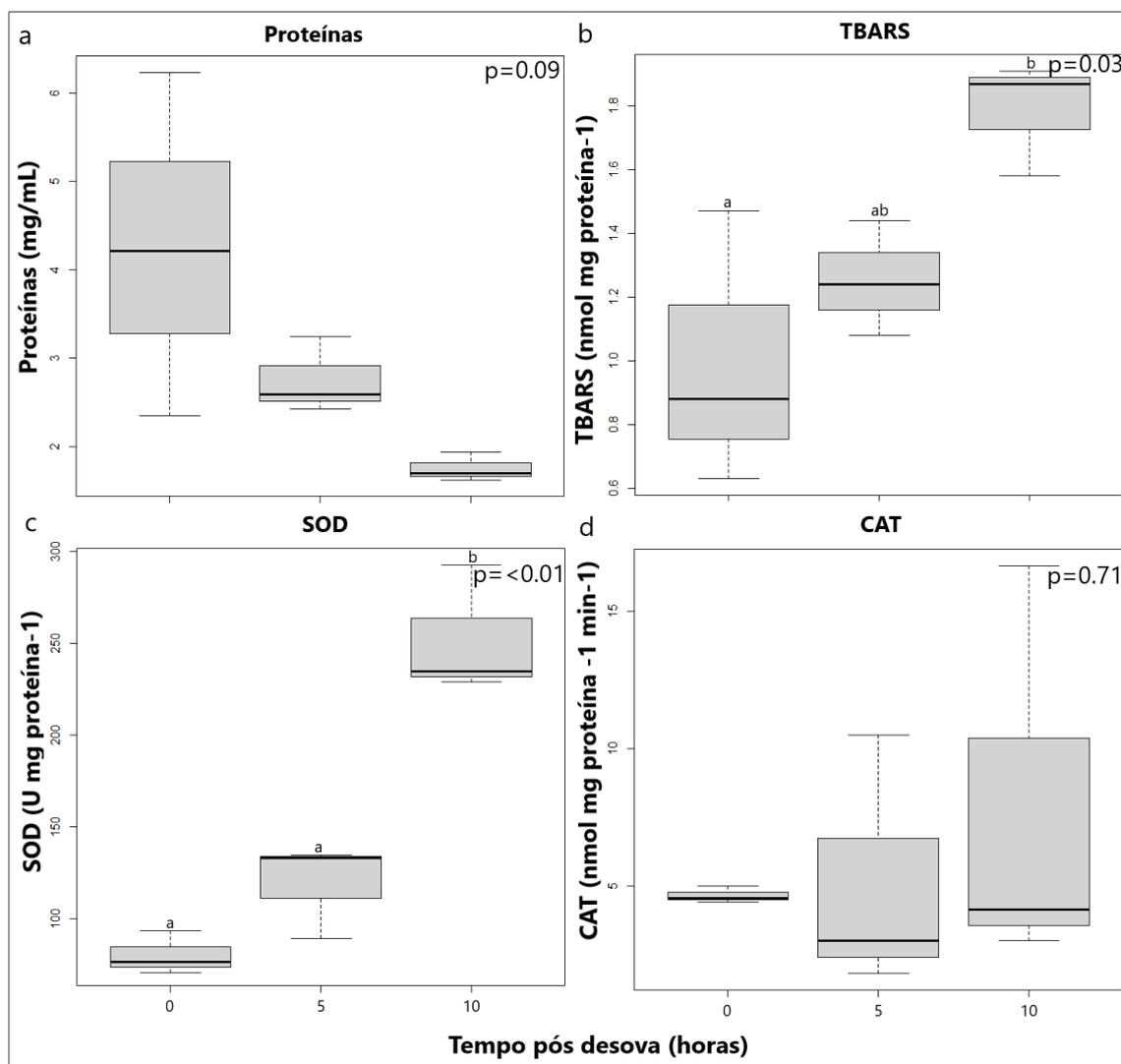


**Fig. 3:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos da saudável de *Mussismilia harttii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .

### 3.2 *Mussismilia braziliensis*

Para a espécie *Mussismilia braziliensis* se comparou os momentos de coleta dos oócitos pós desova, pois todos os gametas são provenientes de colônias saudáveis, as quais não apresentavam nenhum grau de branqueamento.

Os parâmetros que diferiram nos tempos pós desovam foram TBARS e SOD; onde os níveis de TBARS e a atividade enzimática aumentaram entre as 5h e 10h, atingindo valores de cerca de 3,2 e 1,8 vezes maiores que os verificados em 0h ao final do período de estudo (10h pós desova), respectivamente (Figura 4).



**Fig. 4:** Valores de (a) proteínas totais, (b) TBARS, (c) SOD, e (d) CAT ao longo do tempo pós desova para oócitos de *Mussismilia braziliensis*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .

### 3.3 *Mussimilia harttii* x *Mussismilia braziliensis*

Para realizar a comparação entre as espécies, levou-se em consideração apenas os valores médios dos oócitos da colônia saudável de *Mussimilia harttii*, pois os oócitos da *Mussismilia braziliensis* vieram apenas de colônias saudáveis.

Quando se comparou os oócitos obtidos em colônias saudáveis, entre as espécies, considerando também o fator tempo pós desova, encontrou-se diferenças para a SOD em 0h e para as proteínas, o TBARS, a SOD e a CAT em 5h. Nos tempos em que houve diferença, os oócitos da *M. braziliensis* mostraram maior atividade da SOD e CAT às 5h pós desova, sendo estes níveis 2,2 e 3,9 vezes maiores, respectivamente. Os níveis de

TBARS também se mostraram mais elevados, cerca de 4,4 vezes, nos oócitos desta espécie às 5h pós desova. Enquanto os oócitos da *M. harttii* apresentaram maiores níveis de proteínas totais (3,6 vezes) às 5h e, de atividade da SOD (6,7 vezes) às 0h pós desova (Tabela 2).

**Tabela 2:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre os oócitos das duas espécies do gênero *Mussismilia*. Letras diferentes representam diferenças significativas para um  $p < 0,05$ .

	<i>M. braziliensis</i>	<i>M. harttii</i>	Valor-p
<b>Proteína 0h</b>	4.26±2.06	1.75±0.85	0.10
<b>Proteína 5h</b>	2.75±0.98 <sup>a</sup>	9.83±3.50 <sup>b</sup>	0.04*
<b>Proteína 10h</b>	1.75±1.22	5.46±3.81	0.51
<b>TBARS 0h</b>	0.99±0.51	1.88±0.97	0.21
<b>TBARS 5h</b>	1.25±0.23 <sup>a</sup>	0.31±0.05 <sup>b</sup>	<0.01*
<b>TBARS 10h</b>	1.79±0.87	0.89±0.43	0.17
<b>SOD 0h</b>	80.04±28.11 <sup>a</sup>	538.97 ±189.28 <sup>b</sup>	0.04*
<b>SOD 5h</b>	118.94±32.73 <sup>a</sup>	54.67±15.04 <sup>b</sup>	0.03*
<b>SOD 10h</b>	252.17±142.45	195.82±110.62	0.61
<b>CAT 0h</b>	4.66±4.23	16.58±15.05	0.51
<b>CAT 5h</b>	5.11±5.35 <sup>a</sup>	1.29±1.35 <sup>b</sup>	0.04*
<b>CAT 10h</b>	7.94±8.83	4.57±5.09	0.27

Proteína: g dL<sup>-1</sup>; Lipoperoxidação (TBARS): nmol mg proteína<sup>-1</sup>; Superóxido dismutase (SOD): U mg proteína<sup>-1</sup>; Catalase (CAT): nmol mg proteína<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>.

#### 4. Discussão

A gametogênese é o início da reprodução sexual levando a formação de gametas maduros que contêm todo o material para conduzir a fertilização e o desenvolvimento embrionário. Até o momento, a gametogênese em coral foi investigada em muitas espécies e locais em todo o mundo, principalmente a partir de perspectivas ecológicas e histológicas (BAIRD; GUEST; WILLIS, 2009; SHIKINA *et al.*, 2016). Este é o primeiro estudo a estabelecer valores de referência para parâmetros de balanço oxidativo em oócitos de corais da costa nordeste do Brasil, verificando a influência do tempo pós desova e do grau de saúde da colônia sobre a célula gamética feminina.

Sabe-se que a reprodução sexual em corais constitui uma importante ferramenta para o estabelecimento de novas colônias, populações e, portanto, recifes de coral; garantindo a diversidade genética e vantagens adaptativas frente ao ambiente em constantes modificações. Neste processo, os gametas ou larvas que são liberados no ambiente permitem que os corais colonizem diferentes habitats e criem ligações genéticas entre uma região de recife e outra (SHIKINA *et al.*, 2016). Logo, é de suma importância para o oócito do coral manter baixos níveis de EROs no citoplasma, pois se sabe que estas podem atuar sobre a membrana, ocasionando lipoperoxidação e perda de funcionalidade desta, o que pode levar a redução do potencial de fusão entre os gametas feminino e masculino (TAKAHASHI *et al.*, 2003). Levam também, a disfunção mitocondrial e da produção de ATP (ZHANG *et al.*, 2006), além de acelerarem o processo de envelhecimento celular (LORD *et al.*, 2013), dano no código genético, apoptose e morte celular. Assim, o presente estudo se reveste de importância ao estabelecer biomarcadores de qualidade da célula gamética feminina.

##### 4.1 *Mussismilia harttii*

Apesar de nem todos os parâmetros mensurados nos oócitos das colônias terem variado significativamente ao longo do tempo pós desova, há uma tendência de aumento dos níveis de proteínas entre 0h e 5h, seguida por um declínio em 10h. Assim, como uma diminuição da atividade da SOD, da CAT e dos níveis de TBARS de 0h para 5h, e um aumento em 10h. Este perfil de resposta foi observado tanto na colônia saudável como na parcialmente branqueada; contudo, na colônia totalmente branqueada não verificamos alterações significativas nestes parâmetros ao longo do tempo pós desova. Além disso, o

maior nível de atividade das enzimas antioxidantes nas colônias saudáveis e parcialmente branqueadas no tempo 0h pós desova parece refletir, muito mais, uma condição da colônia. Sugerindo assim, um impacto do branqueamento de corais nos oócitos recém liberados. Segundo Weis (2008) o branqueamento de corais se dá pela expulsão das microalgas simbiotes do tecido dos corais, estando este processo relacionado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) o que poderia diminuir as defesas antioxidantes alocadas aos oócitos durante a gametogenese refletindo-se assim, em níveis mais baixos de atividade da SOD e da CAT imediatamente após a desova. Estudo sobre as enzimas antioxidantes em oócitos na metáfase II de humanos e ratos, encontraram expressas as enzimas antioxidantes GPX e SOD, porém nenhuma expressão de CAT (MOUATASSIM; GUÉRIN; MÉNÉZO, 1999). O fato de termos encontrado atividade da CAT em 0h pós desova, em ambas espécies, pode ter ligação com estresse sofrido pelo branqueamento em algum momento da oogênese ou pelos oócitos de coral estarem em fases diferentes da gametogênese em relação aos oócitos do estudo de Mouatassim, Guérin e Ménéz (1999). Quando há baixos níveis de SOD, as EROs não ficam restritas à mitocôndria, pois a permeabilidade mitocondrial é afetada, permitindo troca de moléculas com o citosol, o que pode levar a erros de segregação cromossômica (PERKINS *et al.*, 2016). Entre 0h e 5h pós desova, observamos os menores níveis de atividade da SOD nos oócitos das colônias saudável e parcialmente branqueada, os quais podem estar ligados a ativação de outros componentes do sistema antioxidante e/ou de reparação de dano, o que explicaria o aumento de proteínas disponíveis no oócito e os menores níveis de TBARS.

A variação destes parâmetros ao longo do tempo pós desova talvez possa ser explicada pela presença de ajustes no sistema antioxidante destes gametas a fim de manterem a homeostase oxidativa e possivelmente sua viabilidade, visto que existem outras proteínas e componentes do sistema antioxidante que não foram analisados neste estudo. Reforçando esta hipótese da participação de outros componentes do sistema antioxidante, podemos destacar a glutathione redutase, visto que esta enzima já teve sua atividade quantificada em corais branqueados (DIAS *et al.*, 2020). Sabe-se que uma grande variedade de proteínas fluorescentes (FP) estão presentes em antozoários, embora suas características bioquímicas e função no tecido do hospedeiro ainda não tenham sido totalmente elucidadas. A regulação positiva de FPs ocorre frequentemente em tecido de coral lesado ou comprometido, sugerindo um papel potencial dos FPs de coral na resposta

ao estresse do hospedeiro (PALMER; MODI; MYDLARZ, 2009). Estas proteínas, FPs, também foram observadas microscopicamente em células germinativas e na liberação de ovos de 2 espécies de coral, *Pocillopora verrucosa* e *Montipora capitata* (PADILLA-GAMIÑO *et al.*, 2013). Shikina *et al.* (2016) identificaram e caracterizaram a expressão e a presença de uma FP (proteína fluorescente vermelha) em diferentes estágios de desenvolvimento dos oócitos e nos ovos de *Euphyllia ancora*; confirmando também, uma atividade desta molécula na degradação de peróxido de hidrogênio. Contudo, não podemos descartar uma perda da capacidade antioxidante nestes gametas à medida que se alonga o tempo pós desova o que aproximaria os valores destes parâmetros aqueles verificados nos oócitos da colônia branqueada. Estudos futuros visando analisar a viabilidade destes gametas ao longo do tempo pós desova se fazem necessários.

O hormônio primário da glândula pineal dos vertebrados, a melatonina, vem sendo amplamente identificada em todos os eucariotos e sua função como protetora celular contra radicais livres e a oxidação remonta a ~ 3,6 bilhões de anos (TAN *et al.*, 1993). Esta molécula já foi encontrada em invertebrados, inclusive no antozoário colonial a *Renilla köllikeri*, onde estava concentrada em células neuronais perto de tecidos gametogênicos (MECHAWAR; ANCTIL, 1997). Neste estudo, os autores mostram que a melatonina não atua como um mensageiro fotoperiódico diário, mas pode atuar como um marcador sazonal para a reprodução neste cnidário. Dados em duas outras espécies de anthozoários (*Actinia equina* e *Nematostella vectensis*) mostraram de forma semelhante que a melatonina está localizada perto ou em tecidos gametogênicos. Estes achados suportam a possibilidade de que um dos processos responsivos à melatonina nestas espécies de metazoários basais possa envolver funções reprodutivas. Estudos com o hormônio Melatonina em oócitos de porcos e de ratos, mostraram que esse hormônio é capaz de atrasar o efeito das EROs no gameta por sua capacidade antioxidante (REITER *et al.*, 2003). A Melatonina pode ser sintetizada pela mitocôndria (TAN *et al.*, 2013) e ser estimulada pelo estresse do ambiente. Este hormônio também tem a capacidade de estimular a expressão da Glutathione (GSH), uma potente molécula antioxidante (KIM *et al.*, 2020; LORD *et al.*, 2013).

Outra opção pode ser a existência da Fosfolipase A2, encontrada em todas as classes do filo Cnidaria, presente em seus nematocistos e responsáveis pela captura de presas (NEVALAINEN *et al.*, 2004). A Fosfolipase A2 é uma proteína com capacidade de hidrolisar membranas oxidadas e restaurar sua configuração (VAN DEN BERG *et al.*,

1993). Para complementar a recuperação de lipídeos oxidados, a enzima Fosfolipídio-hidroperóxido glutathiona peroxidase (PHGPX), dependente de selênio, e é capaz de reverter a oxidação de lipídios em GSSG, lipídeos e água (THOMAS *et al.*, 1990; URSINI; MAIORINO; GREGOLIN, 1985). A expressão dessas proteínas pode estar relacionada a tendência de aumento de proteínas disponíveis entre 0h e 5h pós desova, assim como pela tendência a diminuição dos níveis de TBARS no mesmo período.

Uma terceira hipótese é a presença das vitaminas C (ácido ascórbico- AA) e vitamina E (tocoferol), ambas fabricadas por algas (MARKOU; NERANTZIS, 2013) e encontradas em corais (BHANDARI; SHARMA, 2010; HILLYER *et al.*, 2016). O ácido ascórbico (AA) foi encontrado em oócitos de ratos com função antioxidante, ajudando a retardar a apoptose estimulada pelo excesso de EROs (EPPIG *et al.*, 2000). Para espermatozoide humano, mostrou-se que o AA protege o ADN do espermatozoide contra danos oxidativos (FRAGA *et al.*, 1991). Enquanto a vitamina E teve efeitos de recuperação de dano oxidativo de lipídios de membrana em células musculares de porco (BUCKLEY; MORRISSEY; GRAY, 2014). As duas vitaminas fazem parte de um complexo de redox em que há a participação de GSH. O que pode acontecer com os oócitos de coral é que na gametogênese eles recebem as vitaminas pela troca de compostos que ocorrem entre simbionte e hospedeiro via simbiossoma (HILLYER *et al.*, 2016).

Análises histológicas da oogênese após eventos de branqueamento, constataram que corais totalmente ou parcialmente branqueados tinham perda na capacidade de se reproduzirem. Nesses estudos, a oogênese iniciou meses depois em colônias branqueadas, a maturação dos oócitos foi mais lenta e tanto o número de pólipos em gametogênese, quanto o tamanho das gônadas foram menores (CASTRILLÓN-CIFUENTES; MUÑOZ; ZAPATA, 2015; MENDES; WOODLEY, 2002; MICHALEK-WAGNER; WILLIS, 2001; SZMANT; GASSMAN, 1990; WARD; HARRISON; HOEGH-GULDBERG, 2000). Colônias que sofreram branqueamento tiveram número reduzido de pólipos que desovaram, de pacotes por pólipos, e de oócitos por pacote, além de oócitos com menor diâmetro e volume (HAGEDORN *et al.*, 2016; MICHALEK-WAGNER; WILLIS, 2001; PIÑÓN-GONZÁLEZ; BANASZAK, 2018; WARD; HARRISON; HOEGH-GULDBERG, 2000). Após alguns ciclos reprodutivos, entretanto, colônias que foram parcialmente e severamente branqueadas apresentavam gametas semelhantes aos de colônias saudáveis (FISHER *et al.*, 2015; JOHNSTON *et al.*, 2020; LEVITAN *et al.*, 2014). Apesar de colônias branqueadas apresentarem menor capacidade de esforço reprodutivo, em algumas espécies os oócitos são férteis (OMORI *et al.*, 2001; PIÑÓN-

GONZÁLEZ; BANASZAK, 2018), para outras se mostraram inférteis em animais severamente branqueados (MICHALEK-WAGNER; WILLIS, 2001). A baixa fertilidade pode ser explicada, também, pela baixa motilidade dos espermatozoides de colônias branqueadas (OMORI *et al.*, 2001).

Quando fizemos uma média destes marcadores do balanço oxidativo, desconsiderando o tempo pós desova, não verificamos diferenças entre os oócitos liberados pelas colônias com grau de saúde diferente (totalmente branqueada, parcialmente branqueada e saudável). Apesar de repetidos eventos globais de branqueamento de corais verificados nas últimas décadas (AUSTRALIA INSTITUTE OF MARINE SCIENCE, 2017), algumas espécies de coral têm conseguido administrar melhor sua gametogênese sob situações de estresse, como por exemplo, o aquecimento global. Ao analisar parâmetros reprodutivos de colônias branqueadas do Mar Mediterrâneo em Israel, constatou-se por histologia que as colônias branqueadas, na maioria dos casos, exibiram uma oogênese similar àquela das colônias saudáveis. Assim como, também, o número de pólipos em gametogênese, o número de oócitos por pólipo e o diâmetro dos oócitos foram similares aos de colônias saudáveis (ARMOZA-ZVULONI *et al.*, 2011). Estes resultados foram diferentes de um estudo prévio na mesma área, que não constataram desenvolvimento de gônadas em colônias branqueadas (FINE; ZIBROWIUS; LOYA, 2001), mostrando adaptação dos corais para conseguirem se reproduzir mesmo sob estresse. Relatou-se em *Montipora capitata* que a gametogênese continuou durante o branqueamento e não foi observada diferença entre o número de pacotes, oócitos por pacotes e diâmetro dos oócitos entre colônias branqueadas e saudáveis (COX, 2007).

Este parece ser o caso em *M. harttii*, a espécie estudada neste trabalho, em que a qualidade dos oócitos da colônia branqueada e parcialmente branqueada são semelhantes aqueles da colônia saudável. A gametogênese de colônias branqueadas parece estar ocorrendo de forma similar à de colônias saudáveis o que mostra uma capacidade de resistência dos corais durante eventos de branqueamento, e uma grande resiliência para manter o ciclo reprodutivo sem suas zooxantelas. Nossos achados são suportados pelo recente estudo de Godoy *et al.* (2021), no qual verificou-se pela primeira vez que colônias de *M. harttii* e *M. hispida* completamente branqueadas foram capazes de liberar gametas viáveis, e no caso dos espermatozoides, não havia diferença na concentração e no tempo de vida ao comparar colônias saudáveis com branqueadas.

Foi observado em recifes que sofrem eventos de branqueamento seguidos que algumas colônias previamente branqueadas não sofreram um estresse mais severo, ao contrário, se mostraram capazes de se manterem vivas apesar da lenta recuperação e foram menos impactadas em eventos seguintes (FISCH *et al.*, 2019). Para as *Mussismilia*, o gasto energético para manter oogênese estando branqueadas é grande, pois seus oócitos possuem reservas de vitelo, indicando que no começo a larva é lecitotrófica e adquire as zooxantelas na coluna da água (PIRES; CASTRO; RATTO, 1999). Ainda, no vitelo existe a proteína vitelogenina, que possui capacidade antioxidante; em ovos da enguia *Anguilla japonica*, a vitelogenina se mostrou capaz de reduzir a oxidação por cobre (ANDO; YANAGIDA, 1999) e de eliminar radicais livres, além de reconhecer dano celular.

Uma explicação possível para a capacidade de corais branqueados se manterem vivos e ainda terem energia para a gametogênese é a capacidade desses animais buscarem alimentos na coluna da água via heterotrofia e manterem a concentração lipídica em seus tecidos (ARMOZA-ZVULONI *et al.*, 2011; COX, 2007). Estudos que acompanharam a recuperação energética de corais branqueado notaram que em algumas semanas após o evento de branqueamento, colônias branqueadas haviam recuperado suas reservas energéticas e biomassa, apesar de ainda terem baixíssimos níveis de algas em seus tecidos (FISCH *et al.*, 2019; GROTTOLI; RODRIGUES; PALARDY, 2006). A heterotrofia teria, então, um importante papel na resiliência dos corais frente ao branqueamento. Os autores, entretanto, não acreditam que durante a fase de recuperação as reservas energéticas sejam suficientes a ponto de o coral ter a capacidade de reproduzir (GROTTOLI; RODRIGUES; PALARDY, 2006). No tecido de colônias branqueadas de *M. hispida*, foram encontrados elevados níveis de ácido-graxo específico da heterotrofia, enquanto marcadores de ácido-graxo específicos da fotossíntese eram baixos ou inexistentes. Porém, os autores não constataram relação entre branqueamento e ácido-graxo específico da heterotrofia o que pode ser explicado por aumento de temperatura da água e maior quantidade de zooplâncton disponível (MIES *et al.*, 2018).

#### 4.2 *Mussismilia braziliensis*

Nesta espécie, observamos uma tendência de aumento da atividade da SOD e da CAT, aliada a um incremento dos níveis de TBARS e das proteínas totais encontradas nos oócitos ao longo do tempo. Tal conjunto de resposta pode estar relacionado a uma menor alocação da matriz gênica e/ou uma depleção no próprio oócito de moléculas

antioxidantes, como por exemplo aquelas do sistema vitamínico e as FPs. Esta hipótese é reforçada pelo incremento na atividade da SOD e da CAT visando à recuperação ou prevenção de dano oxidativo, hipótese reforçada pela diminuição dos níveis de TBARS. Outro fator importante a se considerar e que pode estar contribuindo de maneira importante com este perfil é que no início da gametogênese as colônias de *M. braziliensis*, já estavam branqueadas, não havendo as algas para que a troca de substâncias entre o hospedeiro e o simbionte ocorresse; além de exigir destes animais, um incremento da heterotrofia, apesar de no momento da desova as colônias terem recuperado suas zooxantelas.

#### 4.3 *Mussimilia harttii* x *Mussimilia braziliensis*

A proteção embrionária contra EROs, depende em parte de um pool endógeno (HARVEY *et al.*, 1995) e em parte exógeno, no caso dos humanos, de fonte materna de mRNA (PIKÓ; CLEGG, 1982). Uma correlação entre mRNA, proteínas e atividade enzimática foi observada para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPX, sugerindo que há uma regulação dessas moléculas a nível pré-tradução (FORSBERG *et al.*, 1996). Isto pode explicar a diferença na quantidade de proteínas e de atividade da SOD e CAT, e dos níveis de TBARS no mesmo período, no qual os oócitos de *M. harttii* podem ter fitas de mRNA advindos da colônia durante as primeiras etapas de gametogênese antes do evento de branqueamento. Enquanto as colônias de *M. braziliensis*, por estarem branqueadas no início da gametogênese, podem não ter transferido fitas de mRNA para seus oócitos por falta de capacidade energética para combater as EROs e a falta de recurso advindo da fotossíntese; além, disto a alocação de substâncias antioxidantes da matriz gênica para os oócitos pode estar reduzida nesta situação.

Apesar dos oócitos obtidos de colônias saudáveis de ambas as espécies estudadas não apresentarem diferenças significativas, a *M. braziliensis* mostrou uma tendência a ter menor quantidade de proteínas totais e de atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT), aliada a maiores níveis de lipoperoxidação (TBARS). Essa diferença na qualidade gamética pode caracterizar um padrão espécie-específico que sugere uma maior sensibilidade ou menor proteção aos oócitos de *M. brasiliensis*. Além disto, em 2019, ocorreu um evento de branqueamento na Bahia que teve início no mês de fevereiro, quando a *M. harttii* já estava em processo de gametogênese há quatro meses (pois sua desova se dá no final de setembro) e a *M. braziliensis* estava se preparando para desovar.

Então ao iniciar a gametogênese de 2019, em março, as colônias de *M. braziliensis* já estavam branqueadas, porém já haviam recuperado suas zooxantelas na desova de 2020.

Essa diferença na época do branqueamento perante a fase de gametogênese pode ser a responsável pela tendência de *M. harttii* apresentar melhor resposta ao dano oxidativo e maior produção de enzimas antioxidantes. Como *M. harttii* começou sua gametogênese saudável, mesmo que ao branquear, as colônias poderiam ter sua reserva de gordura e/ou energética capaz de mantê-las vivas e desenvolverem um oócito de maior qualidade, equivalente ao de colônias saudáveis, enquanto a *M. braziliensis*, ao começar a gametogênese totalmente branqueada, poderia ter pouca reserva energética em seus tecidos para iniciar a produção de oócitos com qualidade e/ou alocar um menor teor de moléculas antioxidantes aos oócitos.

## 5. Conclusões

Este conjunto de resultados sugere que estes animais apresentam um sistema antioxidante robusto constituído por enzimas e moléculas antioxidantes que parecem ser alocadas e/ou sintetizadas nas células gaméticas garantindo e alongando seu tempo de sobrevivência e maximizando possivelmente, sua capacidade de fertilização mesmo em gametas liberados de colônias branqueadas. Estudos futuros visando aprofundar o conhecimento e o entendimento do papel biológico destas moléculas em células gaméticas femininas se fazem necessários; assim como, testes de viabilidade e capacidade de fertilização destes oócitos a longo prazo. Além disto, constatou-se que colônias branqueadas de *M. hartii* apresentam algum mecanismo de resiliência ao branqueamento que as permitem não apenas continuar seu ciclo de oogênese, mas de liberar gametas da mesma qualidade de oócitos de colônias saudáveis. Ao compararmos os parâmetros dos oócitos de colônias saudáveis de *M. braziliensis* e *M. hartii*, verificamos que eles diferiram em todos os parâmetros analisados nas 5h pós desova e na SOD às 10h evidenciando um padrão espécie-específico para estes biomarcadores. Este conjunto de marcadores se mostrou promissor para compararmos o grau de saúde em uma mesma espécie como também, seu comportamento entre espécies.

## Referências

- AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 3, p. 1–21, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28>
- ANDO, Seiichi; YANAGIDA, Kenji. Susceptibility to oxidation of copper-induced plasma lipoproteins from Japanese eel: Protective effect of vitellogenin on the oxidation of very low density lipoprotein. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 1–7, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10137-8](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10137-8)
- ANDRADE, E R; SENEDA, M M; ALFIERI, a a. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.
- ARMOZA-ZVULONI, Rachel *et al.* Repeated bleaching events may result in high tolerance and notable gametogenesis in stony corals: *Oculina patagonica* as a model. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 426, n. March, p. 149–159, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/meps09018>
- AUSTRALIA INSTITUTE OF MARINE SCIENCE, AIMS. **Coral Bleaching Events**. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.aims.gov.au/docs/research/climate-change/coral-bleaching/bleaching-events.html>. Acesso em: 6 dez. 2020.
- BAIRD, Andrew H.; GUEST, James R.; WILLIS, Bette L. Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, [s. l.], v. 40, p. 551–571, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120220>
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira *et al.* Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>
- BARREIROS, André L B S; DAVID, Juceni P. Divulgação. [s. l.], v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BHANDARI, Rupali R.; SHARMA, Prabhat K. UV-B radiation and high light induced oxidative damage in phormidium corium may cause bleaching to associated coral reefs. **Indian Journal of Marine Sciences**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 423–428, 2010.
- BOVERIS, A; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Oberley LW (ed) Superoxide dismutase**, [s. l.], p. 15–30, 1982.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.

General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 707–716, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj1340707>

BROWN, B. E. *et al.* Exploring the basis of thermotolerance in the reef coral *Goniastrea aspera*. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 242, p. 119–129, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/meps242119>

BUCKLEY, D. J.; MORRISSEY, P. A.; GRAY, J. I. Influence of dietary vitamin E on the oxidative stability and quality of pig meat. **Journal of animal science**, [s. l.], v. 73, n. 10, p. 3122–3130, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2527/1995.73103122x>

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. Microsomal lipid peroxidation. *In*: FLEISCHE, Sidney; PACKER, Lester (org.). **Methods in Enzymology**. 52. ed. [S. l.: s. n.], 1978. p. 302–310. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

CASTRILLÓN-CIFUENTES, Ana Lucia; MUÑOZ, Carlos G.; ZAPATA, Fernando A. Reproductive patterns of the coral *Pocillopora damicornis* at Gorgona Island, Colombian Pacific Ocean. **Marine Biology Research**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1065–1075, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17451000.2015.1056798>

CASTRO, C. B.; PIRES, D.O. A bleaching event on a Brazilian coral reef. **Revista Brasileira de Oceanografia**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 87–90, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-77391999000100008>

CASTRO, C. B.; ZILBERBERG, C. Recifes brasileiros, sua importância e conservação. *In*: ZILBERG, C. *et al.* (org.). **Conhecendo os Recifes Brasileiros - Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016. p. 17–26.

COHEN, Anne L.; HOLCOMB, Michael. Why corals care about ocean acidification uncovering the mechanism. **Oceanography**, [s. l.], v. 22, n. SPL.ISS. 4, p. 118–127, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.5670/oceanog.2009.102>

COSTANZA, Robert *et al.* Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 152–158, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2014.04.002>

COX, E. F. Continuation of sexual reproduction in *Montipora capitata* following bleaching. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 721–724, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-007-0251-9>

DEMIDCHIK, Vadim. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 109, p. 212–228, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>

DIAS, Marta *et al.* Integrative indices for health assessment in reef corals under thermal

stress. **Ecological Indicators**, [s. l.], v. 113, n. March, p. 106230, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106230>

DOWLING, Damian K.; SIMMONS, Leigh W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s. l.], v. 276, n. 1663, p. 1737–1745, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1791>

EAKIN, C Mark *et al.* Ding, Dong, The Witch is Dead (?)— Three Years of Global Coral Bleaching 2014–2017. **Reef Currents**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 33–28, 2017.

EPPIG, John J. *et al.* Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes in vitro: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 163, n. 1–2, p. 109–116, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00247-6](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00247-6)

FAUTIN, Daphne Gail. Reproduction of Cnidaria. **Canadian Journal of Zoology**, [s. l.], v. 80, n. 10, p. 1735–1754, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/z02-133>

FINE, M.; ZIBROWIUS, H.; LOYA, Y. *Oculina patagonica*: A non-lessepsian scleractinian coral invading the Mediterranean sea. **Marine Biology**, [s. l.], v. 138, n. 6, p. 1195–1203, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002270100539>

FISCH, Jay *et al.* Physiological and reproductive repercussions of consecutive summer bleaching events of the threatened Caribbean coral *Orbicella faveolata*. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 863–876, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01817-5>

FISHER, Rebecca *et al.* Species richness on coral reefs and the pursuit of convergent global estimates. **Current Biology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 500–505, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.12.022>

FORSBERG, Henrik *et al.* Altered levels of scavenging enzymes in embryos subjected to a diabetic environment. **Free Radical Research**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 451–459, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10715769609088044>

FRAGA, C. G. *et al.* Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 88, n. 24, p. 11003–11006, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11003>

GARRIDO, A. G.; PICCIANI, N.; ZILBERBERG, C. Simbiose coral-zooxantela em um mundo em transformação. In: ZILBERG, C. *et al.* (org.). **Conhecendo os Recifes Brasileiros - Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016. p.

84–96.

GODOY, L.; MIES, M.; ZILBERBERG, C.; PASTRANA, Y. M.; AMARAL, A.; CRUZ, N.; PEREIRA, C.; GARRIDO, A.; PARIS, A.; SANTOS, L. F. A.; PIRES, D. Southwestern Atlantic reef-building corals *Mussismilia* spp. are able to spawn while fully bleached. **Marine Biology**, 168:15, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00227-021-03824-z>

GROTTOLI, Andréa G.; RODRIGUES, Lisa J.; PALARDY, James E. Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. **Nature**, [s. l.], v. 440, n. 7088, p. 1186–1189, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature04565>

HAGEDORN, Mary *et al.* Potential bleaching effects on coral reproduction. **Reproduction, Fertility and Development**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1061–1071, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/RD15526>

HARVEY, M. B. *et al.* Expression of genes encoding antioxidant enzymes in preimplantation mouse and cow embryos and primary bovine oviduct cultures employed for embryo coculture. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 532–540, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.3.532>

HILLYER, Katie E. *et al.* Metabolite profiling of symbiont and host during thermal stress and bleaching in the coral *Acropora aspera*. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 105–118, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1508-y>

HOEGH-GULDBERG, Ove. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine and Freshwater Research**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 839–866, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/MF99078>

HOULBRÈQUE, Fanny; FERRIER-PAGÈS, Christine. Heterotrophy in tropical scleractinian corals. **Biological Reviews**, [s. l.], v. 84, n. 1, p. 1–17, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00058.x>

JOHNSTON, Erika C. *et al.* The legacy of stress: Coral bleaching impacts reproduction years later. **Functional Ecology**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 2315–2325, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13653>

KIM, Eui Hyun *et al.* Melatonin-nrf2 signaling activates peroxisomal activities in porcine cumulus cell-oocyte complexes. **Antioxidants**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9111080>

LAJEUNESSE, T C *et al.* Closely related *Symbiodinium* spp. differ in relative dominance in coral reef host communities across .... **Marine Ecology-Progress Series-**, [s. l.], v. 284, p. 147–161, 2004. Disponível em: <http://www.int->

res.com/articles/meps2004/284/m284p147.pdf%5Cnpapers2://publication/uuid/41AD47B4-CEF4-47E8-8C7C-40DF51B4969E

LEVITAN, Don R. *et al.* Long-term reduced spawning in *Orbicella* coral species due to temperature stress. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 515, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3354/meps11063>

LORD, Tessa *et al.* Melatonin prevents postovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 1–9, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.106450>

MARANGONI, L. F. B.; MARQUES, J. A.; BIANCHINI, A. Fisiologia de corais - a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação. In: ZILBERG, C. *et al.* (org.). **Conhecendo os Recifes Brasileiros - Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016. p. 55–72.

MARKOU, Giorgos; NERANTZIS, Elias. Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1532–1542, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011>

MARTELLI, Felipe; NUNES, Francis Morais Franco. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, [s. l.], v. 66, n. 3, p. 54–57, 2014.

MECHAWAR, Naguib; ANCTIL, Michel. Melatonin in a primitive metazoan: Seasonal changes of levels and immunohistochemical visualization in neurons. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 387, n. 2, p. 243–254, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19971020\)387:2<243::AID-CNE6>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19971020)387:2<243::AID-CNE6>3.0.CO;2-0)

MENDES, J M; WOODLEY, J D. Effect of the 1995-1996 bleaching event on polyp tissue depth, growth, reproduction and skeletal band formation in *Montastrea annularis*. **Marine Ecology Progress Series**, [s. l.], v. 235, p. 93–102, 2002.

MICHALEK-WAGNER, K.; WILLIS, B. L. Impacts of bleaching on the soft coral *Lobophytum compactum*. I. Fecundity, fertilization and offspring viability. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 231–239, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s003380170003>

MIES, M. *et al.* In situ shifts of predominance between autotrophic and heterotrophic feeding in the reef-building coral *Mussismilia hispida*: an approach using fatty acid trophic markers. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 677–689, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-018-1692-z>

MOUATASSIM, S. El; GUÉRIN, P.; MÉNÉZO, Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. **Molecular Human Reproduction**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. 720–725, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molehr/5.8.720>

NEVALAINEN, Timo J. *et al.* Phospholipase A2 in Cnidaria. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 139, n. 4, p. 731–735, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>

OMORI, Makoto *et al.* Significant drop of fertilization of Acropora corals in 1999: An after-effect of heavy coral bleaching? **Limnology and Oceanography**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 704–706, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.3.0704>

PADILLA-GAMIÑO, J. L. *et al.* Are all eggs created equal? A case study from the Hawaiian reef-building coral *Montipora capitata*. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 137–152, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-012-0957-1>

PADILLA-GAMIÑO, J. L. *et al.* Formation and structural organization of the egg-sperm bundle of the scleractinian coral *Montipora capitata*. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 371–380, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-010-0700-8>

PALMER, Caroline V.; MODI, Chintan K.; MYDLARZ, Laura D. Coral fluorescent proteins as antioxidants. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007298>

PERKINS, Adrienne T. *et al.* Oxidative stress in oocytes during midprophase induces premature loss of cohesion and chromosome segregation errors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 113, n. 44, p. E6823–E6830, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1612047113>

PIKÓ, Lajos; CLEGG, Kerry B. Quantitative Changes in Total RNA , Total Poly ( A ), Early Mouse Embryos and Ribosomes in. **Control**, [s. l.], v. 78, p. 362–378, 1982.

PIÑÓN-GONZÁLEZ, Victor M.; BANASZAK, Anastazia T. Effects of partial mortality on growth, reproduction and total lipid content in the Elkhorn coral *Acropora palmata*. **Frontiers in Marine Science**, [s. l.], v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00396>

PIRES, D. O. *et al.* Reprodução de corais de águas rasas do Brasil. *In*: ZILBERG, C. *et al.* (org.). **Conhecendo os Recifes Brasileiros - Rede de Pesquisas Coral Vivo**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2016. p. 111–128.

PIRES, D. O.; CASTRO, C. B.; RATTO, C. C. Reef coral reproduction in the Abrolhos Reef Complex, Brazil: The endemic genus *Mussismilia*. **Marine Biology**, [s. l.], v. 135,

n. 3, p. 463–471, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002270050646>

REITER, Russel J. *et al.* Melatonin as an antioxidant: Biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 50, n. 4, p. 1129–1146, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.18388/abp.2003\\_3637](https://doi.org/10.18388/abp.2003_3637)

RIBEIRO, Sônia Machado Rocha *et al.* A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. Cnidários e Ctenóforos. *In*: RUPPERT, E. E.; BARNES, R. O. (org.). **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. [S. l.: s. n.], 1996. p. 95–170.

SAEIDNIA, Soodabeh; ABDOLLAHI, Mohammad. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [s. l.], v. 273, n. 3, p. 442–455, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.031>

SALIH, Anya; HOEGH-GULDBERG, Ove; COX, Guy. Photoprotection of symbiotic dinoflagellates by fluorescent pigments in reef corals. **Proceedings of the Australian Coral Reef Society 75th Anniversary Conference, Heron Island October 1997**, [s. l.], n. October 1997, p. 217–230, 1998. Disponível em: <http://www.reef.edu.au/OHG/HG/papers/Salih, Hoegh-Guldberg and Cox et al 1997 - fluoro.pdf>

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

SHADEL, Gerald S.; HORVATH, Tamas L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 560–569, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>

SHICK, J. Malcolm; DUNLAP, Walter C. Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 64, n. 1, p. 223–262, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.155802>

SHIKINA, Shinya *et al.* Oocytes express an endogenous red fluorescent protein in a stony coral, *Euphyllia ancora*: A potential involvement in coral oogenesis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. December 2015, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep25868>

SKIRVING, W. J. *et al.* The relentless march of mass coral bleaching: a global perspective of changing heat stress. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 547–557, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00338-019-01799-4>

SOARES, Marcelo de Oliveira; RABELO, Emanuelle Fontenele. Primeiro registro de branqueamento de corais no litoral do Ceará (NE, Brasil): Indicador das mudanças climáticas? **Geociencias**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–10, 2014.

SZMANT, A. M.; GASSMAN, N. J. The effects of prolonged “bleaching” on the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*. **Coral Reefs**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 217–224, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00265014>

TAKAHASHI, Toshifumi *et al.* Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 143–152, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mrd.10341>

TAN, D. X. *et al.* Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 1, p. 57–60, 1993.

TAN, D. X. *et al.* Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin’s primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, [s. l.], v. 54, n. 2, p. 127–138, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jpi.12026>

TCHERNOV, Dan *et al.* Apoptosis and the selective survival of host animals following thermal bleaching in zooxanthellate corals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. 24, p. 9905–9909, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106924108>

THOMAS, James P. *et al.* Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, [s. l.], v. 1045, n. 3, p. 252–260, 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(90\)90128-K](https://doi.org/10.1016/0005-2760(90)90128-K)

URSINI, Fulvio; MAIORINO, Matilde; GREGOLIN, Carlo. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **BBA - General Subjects**, [s. l.], v. 839, n. 1, p. 62–70, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90182-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90182-5)

VAN DEN BERG, Jeroen J.M. *et al.* Conformational Changes in Oxidized Phospholipids and Their Preferential Hydrolysis by Phospholipase A2: A Monolayer Study. **Biochemistry**, [s. l.], v. 32, n. 18, p. 4962–4967, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00069a035>

WARD, S; HARRISON, P; HOEGH-GULDBERG, Ove. Coral bleaching reduces reproduction of scleractinian corals and increases susceptibility to future stress. **Proceedings 9th International Coral Reef Symposium**, [s. l.], n. October, p. 1123–

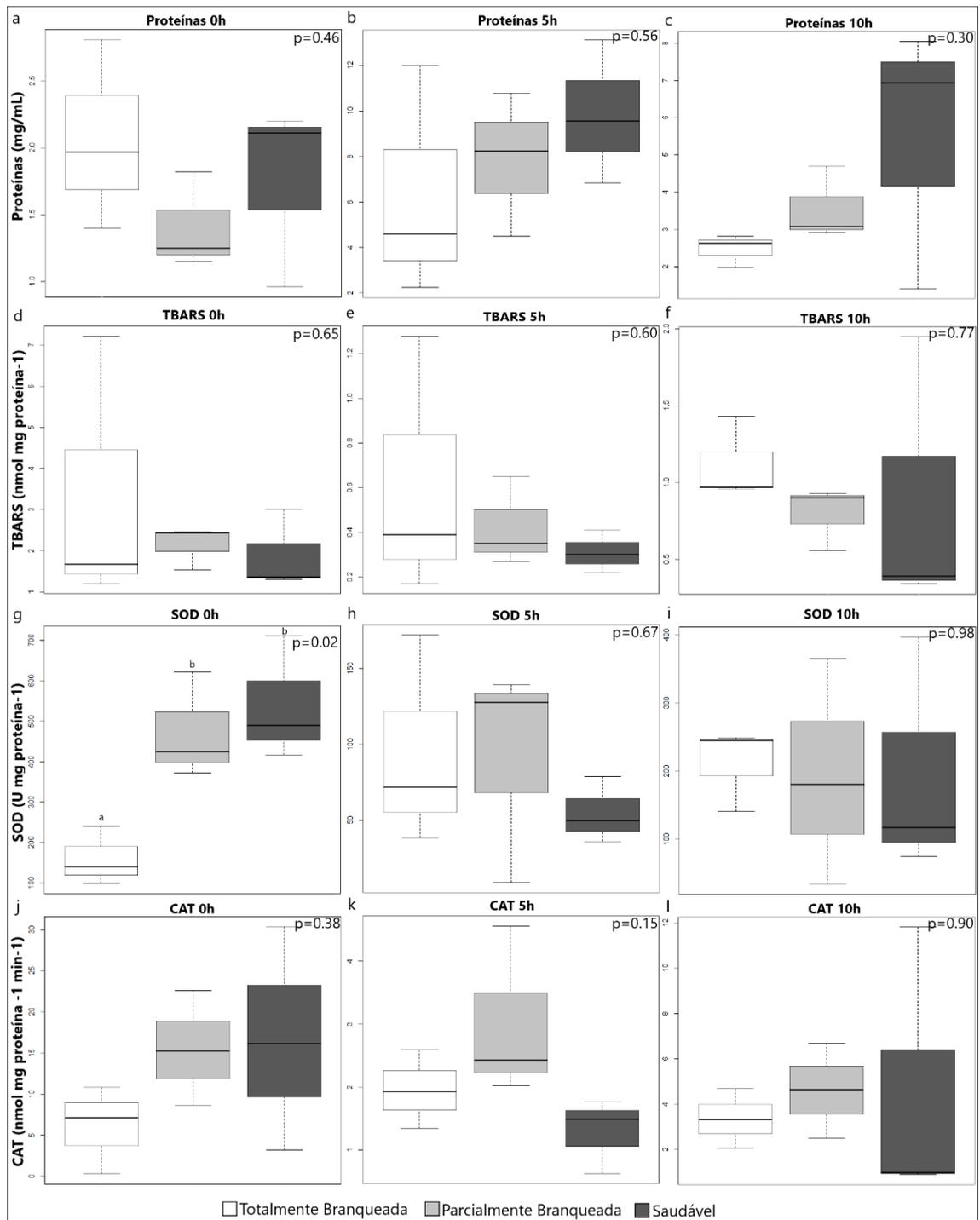
1128, 2000. Disponível em: <http://www.coremap.or.id/downloads/ICRS9th-MS-6-Ward.pdf>

WEIS, Virginia M. Cellular mechanisms of Cnidarian bleaching: Stress causes the collapse of symbiosis. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 211, n. 19, p. 3059–3066, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.009597>

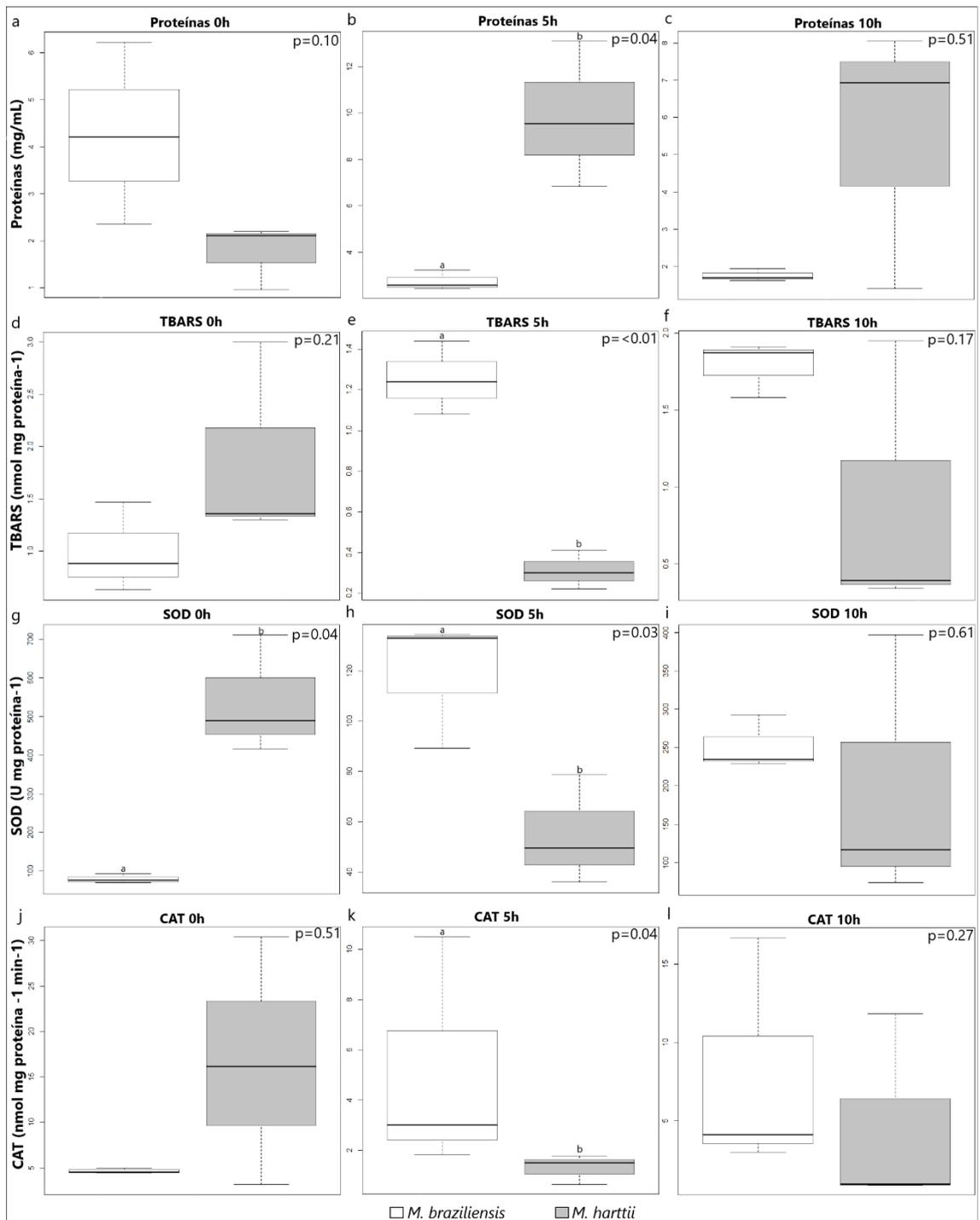
YELLOWLEES, David; REES, T. Alwyn V.; LEGGAT, William. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 679–694, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01802.x>

ZHANG, Xiao *et al.* Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. **Cell Research**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 841–850, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310095>

## Apêndice



**Fig. 5:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre cada colônia de *Mussismilia hartii*. Letras diferentes representam diferenças para um  $p < 0,05$ .



**Fig. 6:** Parâmetros bioquímicos analisados ao longo do tempo pós desova entre os oócitos das duas espécies do gênero *Mussismilia*. Letras diferentes representam diferenças significativas para um  $p < 0,05$ .